

# **SÍNTESE DE ACETATO DE DECILO POR CATÁLISE ENZIMÁTICA EM MEIO SUPERCRÍTICO**

**Sílvia Andreia da Silva Fernandes Rebocho**

**Lisboa, Março de 2008**



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**Faculdade de Ciências e Tecnologia**  
**Departamento de Química**

# **Síntese de Acetato de Decilo por Catálise Enzimática em Meio Supercrítico**

**Por**

**Sílvia Andreia da Silva Fernandes Rebocho**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências  
e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientador:  
Professor Doutor José Miguel Loureiro

Co-orientador:  
Professora Doutora Maria Eugénia Macedo

**Lisboa**

**2008**



*Aos meus queridos pais, irmã e amigos que  
sempre fizeram tudo para que eu fosse feliz!*



*Pedras no caminho? Guardo todas, um dia vou construir um castelo...*

*Fernando Pessoa*





## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, tenho que expressar os meus sinceros agradecimentos à minha querida Manuela Vilarinho pela enorme ajuda que me deu nestas últimas semanas. Com a sua boa disposição, rigor científico e grande conhecimento académico permitiu que a elaboração escrita deste trabalho se tornasse uma tarefa promissora e com grandes perspectivas para o trabalho futuro.

À Professora Maria Eugénia Macedo um muito obrigada do fundo do coração pela preocupação, simpatia e ajuda durante todo este período e em especial nestes últimos dias em que me acolheu com um enorme sorriso na FEUP.

À Professora Susana Barreiros um especial agradecimento pelo acolhimento no seu laboratório. Pela oportunidade de voltar a trabalhar na FCT, pela boa disposição, ajuda e conhecimento científico.

Ao Professor José Miguel Loureiro, obrigada pela partilha de informação, ajuda e interesse pelo trabalho.

Um muito obrigada aos meus queridos colegas Pedro Vidinha e Adriano Ribeiro, por me ensinarem tantas coisas novas e pela paciência durante todos estes meses. Obrigada pela partilha dos vossos amplos conhecimentos.

Aos meus recentes colegas e amigos do Porto, Ana Mafalda, Diogo, Herney e Alejandro um muito obrigada pela simpatia, ajuda e em especial pela óptima companhia durante estes dias.

Às minhas queridas meninas, companheiras e amigas do laboratório da FCT, Bruna, Tânia e Diana um muito obrigada pela ajuda e por todos os momentos que passamos a trabalhar e não só! Juntas aprendemos que se podem fazer grandes amizades nos locais de trabalho!

Aos restantes colegas, Alexandre Paiva pela ajuda inicial que me deu a aprender a trabalhar a “altas pressões”! Ao Gustavo, Mário e Ricardo, um muito obrigada pela apoio e companheirismo saudável durante este tempo em que trabalhámos juntos.

Aos meus queridos pais pelo amor e paciência demonstrada ao longo de todos estes anos. Vocês serão sempre os melhores pais do Mundo!!!

À minha mana um grande beijinho por todos os momentos que dividimos diariamente. Pela companhia e dedicação um muito obrigada.

A todos os meus amigos, principalmente as minhas queridas amigas Cristina, Mafalda e Ana e ao meu querido Pedro um especial agradecimento, por todos os extraordinários momentos! Vocês estarão sempre no meu coração!

À Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento do Projecto POCI/EQU/56732/2004 “Síntese de Acetato de Decilo por Catálise Enzimática em Meio Supercrítico”.

**MUITO OBRIGADA A TODOS!**

## SUMÁRIO

Este trabalho teve como objectivo o estudo, em reactor fechado, da produção de ésteres de cadeia longa por catálise enzimática em meio supercrítico com vista ao desenvolvimento de um processo sustentável, tecnologicamente eficiente e limpo e que constitua uma alternativa aos processos químicos tradicionais.

Como composto modelo a produzir foi seleccionado o acetato de decilo, um éster com aplicação na indústria de fragrâncias. A reacção estudada foi a transesterificação do acetato de vinilo com o decanol, obtendo-se como principal produto o acetato de decilo. O catalisador escolhido foi a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), imobilizada na resina macroporosa Lewatit B (Novozym 435®).

A síntese de acetato de decilo foi estudada numa instalação experimental de alta pressão, equipada com um reactor fechado de volume variável, a operar isotermicamente a 35 °C e a 100 bar, usando-se como solvente CO<sub>2</sub> em condições supercríticas.

Fez-se a determinação do conteúdo enzimático por tamanho de partícula de catalisador, tendo-se verificado que as partículas mais pequenas têm uma quantidade específica de enzima mais elevada, havendo uma relação inversamente proporcional entre o conteúdo enzimático e o tamanho de partícula. Verificou-se também que a enzima deve estar localizada numa camada exterior da partícula, seguindo um modelo do tipo “casca de ovo”, sendo a espessura dessa camada de 60 µm (assumindo distribuição uniforme) e independente do tamanho de partícula.

Analisaram-se as resistências à transferência de massa, tanto externas como internas. Para as primeiras, fez-se apenas variar a agitação dentro do reactor, mantendo todas as outras condições de operação constantes (temperatura, pressão, quantidade de enzima, tamanho de partícula, concentração de substratos na alimentação). Verificou-se que a partir de 950 r.p.m. as resistências externas à transferência de massa são eliminadas.

Relativamente às resistências internas, realizaram-se várias reacções com diferentes tamanhos de partícula, mas com a mesma quantidade de enzima, a mesma concentração dos dois substratos na alimentação, a mesma agitação, temperatura e pressão. Os resultados obtidos mostram que não há influência significativa do tamanho das

partículas de catalisador sobre a velocidade inicial de reacção, pelo que as resistências internas à transferência de massa se podem considerar desprezáveis.

Estudou-se também o efeito da variação da concentração dos substratos na alimentação sobre as velocidades iniciais de reacção. Observou-se que a partir de uma determinada concentração de decanol em excesso relativamente ao acetato de vinilo, a reacção é inibida pelo álcool. Pelo contrário, a reacção é favorecida quando a alimentação tem excesso de acetato de vinilo, havendo um aumento significativo da sua velocidade inicial. Estes resultados são consistentes com um mecanismo do tipo Ping-pong bi-bi com inibição competitiva por parte do álcool, comum na descrição de reacções enzimáticas de esterificação/transesterificação.

Por último, fez-se uma comparação dos resultados obtidos em meio supercrítico (CO<sub>2</sub>) e em meio orgânico (hexano). Observou-se que as reacções em hexano apresentam uma velocidade inicial significativamente superior.

**Palavras-chave:** Catálise enzimática; Reactor fechado; CO<sub>2</sub> supercrítico; Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada; Transesterificação; Mecanismo Ping-pong bi-bi; Decanol; Acetato de vinilo; Acetato de decilo.

## ABSTRACT

The main purpose of this work was the study of long chain esters production, in a batch reactor, by enzymatic catalysis in supercritical media, with the aim of developing a sustainable, clean and efficient process as an alternative to the traditional chemical processes.

Decyl acetate, an ester with applications in the industry of fragrances, was chosen as model compound. The reaction studied was the transesterification of vinyl acetate with decanol, obtaining decyl acetate as the main product. Lipase B of *Candida antarctica* (CALB), immobilized in the macroporous resin Lewatit B (Novozym 435®), was chosen as catalyst.

The synthesis of decyl acetate was studied in a high-pressure experimental set-up, equipped with a variable volume batch reactor, operating isothermally at 35 °C and 100 bar, using as solvent CO<sub>2</sub> in supercritical conditions.

The enzymatic content was determined for each particle size of the catalyst. It was shown that the smallest particles have a higher specific amount of enzyme, with an inversely proportional relation between the enzymatic content and the particle size. It seems that the enzyme is located in an external shell of the particle, following an “egg-shell” model type, with a thickness of 60 µm (assuming a homogeneous distribution), independent of the particle size.

The mass transfer resistances were evaluated, both external and internal. For the first ones, the reactor stirring speed was varied, keeping all the other conditions constant (temperature, pressure, amount of enzyme, particle size, initial substrate concentrations). The experimental results showed that external mass transfer resistances are eliminated by an agitation of 950 r.p.m.

To access internal mass transfer resistances, several reactions were performed using different particle sizes, but with the same amount of enzyme, the same initial substrate concentrations, the same stirring speed, temperature and pressure. The results show that the size of the catalyst particles does not have a significant effect on the initial reaction rate. Therefore, the internal diffusional limitations can be considered as negligible.

The effect of the feed concentration of substrates on the initial reaction rate was also studied. It was observed that, from a certain concentration of decanol in excess

relatively to vinyl acetate, the reaction is inhibited by the alcohol. On the contrary, the reaction is favored when the reactor is fed with excess of vinyl acetate, with a significant enhancement of its initial rate. These results are consistent with a Ping-pong bi-bi type mechanism with competitive inhibition by the alcohol, commonly used in the description of enzymatic reactions of esterification/transesterification.

Finally, a comparison of the results in supercritical media (CO<sub>2</sub>) and organic media (hexane) was done. It was observed that, in hexane, the initial rates of reaction are significantly larger.

Keywords: Enzyme catalysis; Batch reactor; Supercritical CO<sub>2</sub>; immobilized *Candida antarctica* lipase B; Transesterification; Ping-pong bi-bi mechanism; Decanol; Vinyl acetate; Decyl acetate.

## Nomenclatura:

$[A]$	concentração de acetato de vinilo (M)
$Abs$	absorvância (nm)
$[B]$	concentração de decanol (M)
$K_I$	constante de inibição competitiva (M)
$K_{Mi}$	constante de Michaelis para o substrato i (M)
$m^{enz}$	massa de enzima na partícula (g)
$P_c$	pressão crítica (bar)
$R$	raio total da partícula de catalisador (mm)
$r$	raio da partícula de catalisador sem camada de enzima (mm)
$T_c$	temperatura crítica ( °C)
$v$	velocidade da reacção(mol/min.g catalisador)
$v^{enz}$	volume de enzima na partícula (mm <sup>3</sup> )
$V_{max}$	velocidade máxima da reacção (mol/min.g catalisador)

## Abreviaturas e/ou siglas:

$ADM$	válvula cromatográfica
$BSA$	albumina sérica bovina
$C$	compressor
$CALB$	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
$CO_2$	dióxido de carbono
$FID$	detector de ionização de chama
$GC$	cromatógrafo de gás
$GB$	gás (CO <sub>2</sub> )
$LF$	filtro
$PT$	transdutores de pressão
$M$	medidor de pressão
$MP$	bomba manual de água
$MS$	peneiros moleculares
$MSt$	placa de agitação

<i>S1</i>	adição de reagentes
<i>S2</i>	adição de solvente de lavagem
<i>S3</i>	adição de água
<i>SAMP</i>	válvula de amostragem (3 vias)
<i>sc-CO<sub>2</sub></i>	CO <sub>2</sub> supercrítico
<i>TB</i>	banho de água termostatizado
<i>V</i>	válvulas
<i>VVC</i>	Reactor de volume variável



## Índice Geral

1. Introdução .....	1
Enzimas .....	1
Aplicações Industriais .....	1
Lipases .....	2
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) .....	3
Mecanismo reaccional das lipases .....	5
Biocatálise em meios não convencionais .....	7
Biocatálise em Fluidos Supercríticos .....	10
Ésteres .....	11
2. Materiais e Métodos .....	15
2.1 Catalisador .....	15
2.2 Reagentes e Padrões .....	15
2.3 Determinação do conteúdo enzimático – método de Lowry .....	15
2.4 Método de análise da mistura reaccional do reactor fechado .....	17
2.4.1 Calibração do cromatógrafo .....	18
2.5 Instalação Experimental .....	19
2.6 Técnica Experimental .....	22
2.6.1 Modo de operação de uma experiência em reactor fechado .....	22
3. Resultados e sua discussão .....	25
3.1 Curvas de calibração .....	25
3.1.1 Espectrofotómetro .....	25
3.1.2 Cromatógrafo de gás (método do padrão interno) .....	25
3.2 Determinação do conteúdo enzimático das partículas de catalisador .....	27
3.3 Avaliação das resistências à transferência de massa .....	30

3.3.1 Avaliação da resistência externa à transferência de massa .....	30
3.3.2 Avaliação da resistência interna à transferência de massa .....	32
3.4 Avaliação do efeito da concentração dos substratos na alimentação .....	34
3.5 Comparação das experiências em meio orgânico e meio supercrítico (CO <sub>2</sub> ) para a produção de acetato de decilo .....	37
4. Conclusões .....	39
5. Bibliografia .....	41
Anexos .....	49

## Índice de Figuras

*Figura 1.1: Pormenor da tampa que cobre o centro activo de uma lipase, na presença de solventes com diferentes polaridades (adaptado de Verger, (1997)).*

*Figura 1.2: Estrutura tridimensional da lipase B de Candida antarctica (CALB)*

*Figura 1.3: Representação do mecanismo Ping-pong bi-bi. A e B são substratos, P e Q são produtos, E e F são diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ são complexos de transição.*

*Figura 1.4: Diagrama de fases do CO<sub>2</sub>.*

*Figura 2.1: Exemplo de um cromatograma da mistura reaccional.*

*Figura 2.2: Esquema da instalação experimental usada nas reacções em reactor fechado:*

*GB – gás (CO<sub>2</sub>); V - válvulas; M - medidor de pressão; LF - filtro; C - compressor; MS - peneiros moleculares; S1 - adição de reagentes; S2 - adição de solvente de lavagem; S3 - adição de água; PT – transdutores de pressão; MP – bomba manual de água; ADM – válvula cromatográfica; VVC – reactor; MSt – placa de agitação; SAMP – válvula de amostragem (3 vias); TB – banho de água termostatizado.*

*Figura 2.3: Reactor de volume variável:*

*1 – Janela de safira; 2 – Anel de teflon; 3 – Anel de ertacetal; 4 – Agitador magnético; 5 – O-rings; 6 – Êmbolo de teflon; 7 – Anel de teflon; 8 – Pistão.*

*Figura 2.4: Instalação experimental usada nas reacções em reactor fechado.*

*Figura 2.5: Reactor de volume variável.*

*Figura 3.1: Curva de calibração do espectrofotómetro.*

*Figura 3.2: Curva de calibração obtida para o decanol.*

*Figura 3.3: Curva de calibração obtida para o acetato de decilo.*

*Figura 3.4: Representação esquemática de duas partículas de tamanhos diferentes de enzima imobilizada.*

*Figura 3.5: Efeito da velocidade de agitação do reactor na conversão dos reagentes ao longo do tempo.*

*Figura 3.6: Efeito do tamanho de partícula do catalisador na conversão dos reagentes ao longo do tempo.*

*Figura 3.7: Variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de decanol na alimentação, mantendo a concentração inicial de acetato de vinilo constante.*

*Figura 3.8: Variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de acetato de vinilo na alimentação, mantendo a concentração inicial de decanol constante.*

*Figura 3.9: Variação da velocidade inicial da reacção em função dos diferentes tamanhos de partícula em  $sc\text{-CO}_2$  e em hexano.*

## **Índice de Tabelas**

*Tabela 1.1: Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos (Smith et al., 2005).*

*Tabela 2.1: Tamanhos de partícula do catalisador.*

*Tabela 2.2: Concentrações pretendidas e massas pesadas dos compostos utilizados na preparação dos padrões.*

*Tabela 3.1: Concentrações dos padrões e áreas obtidas na calibração do cromatógrafo.*

*Tabela 3.2: Conteúdo enzimático para os diferentes tamanhos de partícula.*

*Tabela 3.3: Condições de operação das experiências para avaliação das resistências externas à transferência de massa.*

*Tabela 3.4: Velocidade inicial de reacção nas experiências com diferentes velocidades de agitação.*

*Tabela 3.5: Condições de operação das experiências para avaliação das resistências internas à transferência de massa.*

*Tabela 3.6: Velocidades iniciais da reacção nas experiências com diferente tamanho de partícula de catalisador.*

*Tabela 3.7: Condições das experiências com diferentes concentrações dos substratos na alimentação.*









## **1. INTRODUÇÃO**

### **Enzimas**

As enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reacções químicas que ocorrem em células e outros organismos sem se alterarem. Estas apresentam diversas vantagens relativamente aos seus congéneres químicos, em particular a regioselectividade (preferência por um entre vários grupos funcionais idênticos na molécula de substrato), a enantioselectividade (preferência por um enantiómero) e a quimioselectividade (favorecimento de um determinado grupo funcional do substrato). A crescente procura de enzimas para aplicações industriais (Ghanem e Aboul-Enein, 2005; Krishna, 2002; Schmid et al., 2002) está precisamente relacionada com a selectividade para o substrato: capacidade de discriminar substratos distintos mas estruturalmente semelhantes (Klibanov, 2001).

Do ponto de vista energético, as enzimas são também muito eficientes, uma vez que operam a temperaturas e pressões moderadas, assim como em gamas moderadas de valores de pH (Cabral et al, 2003).

Estes catalisadores são extremamente eficientes do ponto de vista do aumento de velocidade que proporcionam relativamente à reacção não catalisada. Geralmente, a ligação do substrato à enzima é um processo que se dá com uma variação de energia de Gibbs negativa, o que contribui para a estabilização do substrato. É precisamente este facto de a afinidade da enzima para o estado de transição ser maior do que para o substrato que explica a diminuição da energia de Gibbs de activação associada à acção das enzimas (Price et al., 2001).

### **Aplicações Industriais**

A indústria química representa um dos maiores sectores económicos do mundo. O uso de enzimas para aplicações industriais é, nos dias de hoje, um mercado em grande expansão. O desenvolvimento e a utilização destes catalisadores biológicos está continuamente a crescer, nomeadamente em áreas como a farmacêutica e a agroquímica, nas quais é cada vez maior o interesse por compostos enantiomericamente puros ou intermediários com funcionalidades específicas (Carrea e Riva, 2000; Schmid et al., 2002; Vellard, 2003).

Estima-se que o impacto na área alimentar, na química fina, nos antibióticos e compostos intermediários, materiais plásticos e sintéticos, detergentes e produtos de higiene seja ainda maior no futuro. Isto deve-se ao facto das enzimas poderem ser modificadas de maneira a controlar a sua estabilidade/actividade em condições pouco usuais de temperatura e de pH ou em ambientes não-convencionais, por exemplo em solventes orgânicos. Uma das propriedades potencialmente interessantes no âmbito da aplicabilidade industrial prende-se com as características da superfície dos catalisadores. De facto, a actividade de muitas enzimas utilizadas industrialmente, por exemplo as lipases, depende da sua capacidade de se ligar ou adsorver, com eficiência, aos substratos ou interfaces (Schmid et al., 2002; Cabral et al., 2003).

Outro sector em que se prevê um aumento muito significativo nas aplicações industriais de enzimas é nas áreas clínicas e de diagnóstico, em particular no desenvolvimento de biossensores. Um biossensor é um dispositivo analítico que incorpora um agente biológico (p. e. enzima) como parte fundamental do processo de reconhecimento e quantificação de um dado composto a analisar (Cabral et al., 2003).

Na indústria biotecnológica têm sido estudados bioencapsulados como biossensores, na monitorização de bioprocessos ou processos relacionados com o ambiente, em análises alimentares, no diagnóstico clínico, como no caso dos sensores de glucose que são extremamente utilizados no diagnóstico da diabetes (Coradin e Lopez, 2003; Krajewska, 2004).

## **Lipases**

As lipases são certamente as enzimas com maior interesse prático devido ao facto de aceitarem uma grande variedade de substratos, possuírem uma estabilidade relativamente alta, não necessitarem de cofactores dispendiosos e de poderem em muitos casos ser facilmente obtidas comercialmente e com produtividade elevada a partir de microrganismos, nomeadamente fungos e bactérias. O facto de a estrutura de muitas lipases ser conhecida facilita a aplicação de novas estratégias de modelação da actividade das mesmas de uma forma mais racional (Jaeger e Eggert, 2002). As lipases podem ser usadas em várias reacções de esterificação, interesterificação e hidrólise de ésteres (Reetz et al., 1995).

As lipases possuem um aspecto muito interessante em relação ao mecanismo de acesso ao centro activo. Este está coberto por um segmento de aminoácidos com uma estrutura

de hélice  $\alpha$ . Esta “tampa” de natureza anfifílica é constituída por aminoácidos polares na parte externa e por aminoácidos apolares na parte interna, em contacto com o centro activo. Quando estão numa solução aquosa, as lipases têm a “tampa” fechada, com a parte polar em contacto com a água, impedindo assim o acesso das moléculas de substrato ao centro activo. Devido a este facto, a actividade das lipases é relativamente baixa em solução aquosa (Cabral et al., 2003). No entanto, na presença de agregados de substratos em meios aquosos originam interfaces hidrofóbicas-hidrofílicas, ou ainda, na presença de um solvente hidrofóbico, verifica-se uma alteração conformacional na enzima levando a que ocorra uma estabilização na conformação da tampa na posição aberta (Figura 1.1). O centro activo da enzima fica assim acessível aos substratos. Este fenómeno é designado por activação interfacial (Kuncová et al., 2003; Antezac et al., 2002; Verger, 1997).

As lipases têm inúmeras aplicações, de onde se destacam as indústrias de detergentes, alimentar, do papel, oleoquímica, cosmética, farmacêutica, agroquímica e também na síntese de tensioactivos. Nas indústrias alimentar, cosmética e farmacêutica, as reacções de síntese catalisadas por lipases são de particular interesse, especialmente reacções de esterificação, transesterificação e interesterificação; na indústria dos detergentes, as reacções de hidrólise são as mais interessantes, uma vez que a actividade hidrolítica tem especial importância na acção dos detergentes (Cabral et al., 2003; Serralha, 2001).

### **Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)**

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é, de entre várias enzimas, uma das mais utilizadas em biocatálise. Vários estudos têm demonstrado que esta enzima é particularmente útil na síntese de ésteres e aminas. A CALB mostra uma alta selectividade do substrato em relação à regioselectividade e enantioselectividade. Sendo altamente regioselectiva na síntese de monoésteres de hidratos de carbono e enantioselectiva na resolução de inúmeros compostos, como, por exemplo, aminas, álcoois e ácidos e também na preparação de compostos opticamente activos de reagentes meso (Kirk e Christensen, 2002; Öhrner et al., 1996; Rotticci et al., 2001).

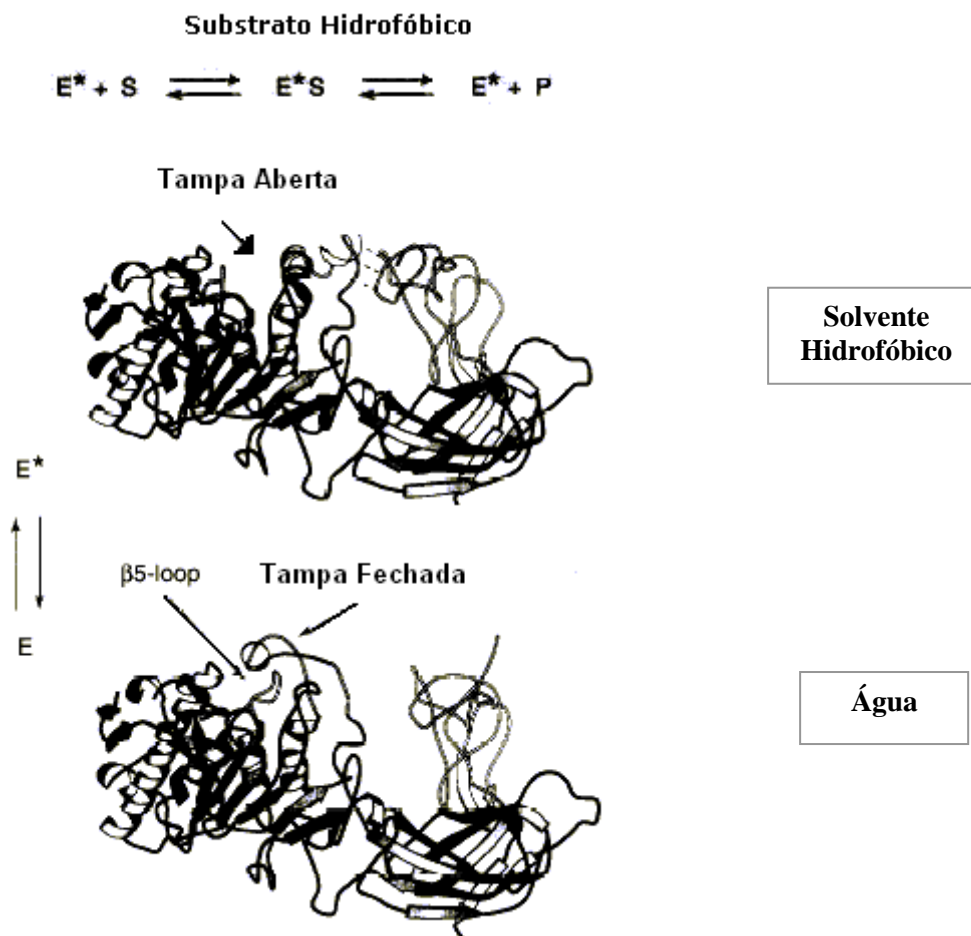


Figura 1.1: Pormenor da tampa que cobre o centro activo de uma lipase, na presença de solventes com diferentes polaridades (adaptado de Verger, 1997).

A estrutura desta enzima foi determinada em 1994. Esta lipase é constituída por 317 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 33 kDa (Figura 1.2). O centro activo desta enzima é constituído pela tríade catalítica Serina 105 – Histidina 224 – Aspartato 187 (Uppenberg et al., 1994). Esta enzima, ao contrário da maioria das lipases, não apresenta activação interfacial, uma vez que não possui a tampa característica da maior parte deste tipo de enzimas. O acesso ao centro activo faz-se por um canal estreito, tendo ainda a particularidade da existência de uma pequena hélice com elevada mobilidade perto do centro activo.

A CALB encontra-se disponível no mercado, sob vários tipos de preparações, na forma livre ou imobilizada através de ligação iónica, esta mais utilizada em meios não aquosos (Rotticci et al., 2001). A CALB imobilizada apresenta uma elevada estabilidade durante

longos períodos de tempo na gama de temperaturas 60-80 °C. (Anderson, et al., 1998; Kirk e Christensen, 2002).



*Figura 1.2: Estrutura tridimensional da lipase B de Candida antarctica (CALB).*

### **Mecanismo reaccional das lipases**

O mecanismo destas enzimas é normalmente descrito pelo modelo Ping-pong bi-bi (Figura 1.3). O termo Ping-pong aplica-se aos mecanismos em que um ou mais produtos são libertados da enzima antes que todos os substratos sejam adicionados. Neste tipo de mecanismo, o grupo a ser transferido é primeiro deslocado do substrato A pela enzima para formar o produto P e uma forma modificada da enzima (F). De seguida ocorre a transferência de F para o segundo substrato B, formando-se o produto Q e regenerando-se E (Murray et al., 2003). O primeiro passo é o de acilação, pelo que o primeiro substrato a ligar-se à enzima será o que fornece o grupo acilo ( $R-CO-$ ) sendo designado por agente acilante (Warshel, et al., 1989; Daggett et al., 1991; Hedstrom, 2002).

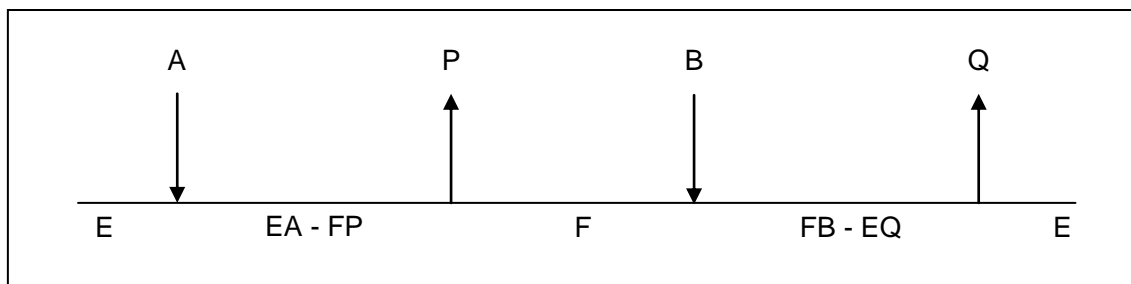


Figura 1.3: Representação do mecanismo Ping-pong bi-bi. A e B são substratos, P e Q são produtos, E e F são diferentes configurações da enzima livre, EA-FP e FB-EQ são complexos de transição.

É importante referir o que se passa no centro activo da enzima que é constituído pela tríade catalítica Serina 105 – Histidina 224 – Aspartato 187. Inicialmente, o oxigénio do grupo hidroxilo da Serina ataca o átomo de carbono do grupo carbonilo do substrato. A ligação C=O do substrato transforma-se numa ligação simples e o átomo de oxigénio adquire uma carga negativa. Forma-se um estado de transição de geometria tetraédrica em torno daquele carbono, através de pontes de hidrogénio entre o oxianião e dois grupos NH de cadeias principais. Com a formação desta entidade, ocorre a transferência de um protão da Serina para a Histidina. O Aspartato (o ácido aspártico tem que estar desprotonado) neutraliza, em parte, a carga que se desenvolve no estado de transição. A ligação carbonilo é então refeita, com o auxílio da forma protonada da Histidina que perde o protão, e dá-se o colapso do intermediário tetraédrico com expulsão de um primeiro produto (o álcool). A cadeia alquilo do primeiro substrato permanece ligada covalentemente à Serina, formando o intermediário acil enzima. Completa-se assim o passo de acilação. Seguidamente ocorre o passo de desacilação que se desenrola de forma semelhante, mas por ordem inversa. Inicia-se assim com o ataque nucleofílico à acil-enzima, por parte do reagente álcool (na reacção de transesterificação) ou da água (na reacção de hidrólise), resultando na formação, mais uma vez com o auxílio da Histidina, de um novo intermediário tetraédrico que colapsa com libertação de um segundo produto (éster, na reacção de transesterificação, e ácido, na reacção de hidrólise). A enzima regressa assim ao estado inicial.

### **Biocatálise em meios não convencionais**

A utilização de enzimas em solventes orgânicos é bastante comum nos dias de hoje, mas o interesse, divulgação e aplicação destes sistemas é relativamente recente (Halling e Kvittingen, 1999).

No início da década de 80 do século XX os trabalhos de Zacks e Klibanov (1985) revolucionaram a área da biocatálise, tornando-se como precursores de inúmeras aplicações industriais. A importância do trabalho destes dois autores e o completo desconhecimento do trabalho de Ernest Alexander Sym, faz com que muitos pensem que este fenómeno era completamente desconhecido antes de Zacks e Klibanov. Mas de facto, os primeiros trabalhos datam de há mais de 50 anos atrás (Halling e Kvittingen, 1999).

O mais extraordinário é que muitos dos estudos realizados actualmente poderiam ter sido feitos nos anos 30. As razões pelas quais a biocatálise em meios não aquosos não avançou nessa altura podem ser explicadas fundamentalmente pela inexistência de aplicações para a descoberta. Por outro lado, a existência do dogma de que as enzimas não poderiam funcionar na ausência de água, bem como a ausência de conhecimento científico sobre a estrutura e os mecanismos reaccionais das enzimas, contribuíram para que a biocatálise em meios não aquosos permanecesse na obscuridade até à década de 80, e só nessa altura emergisse como área de enorme expansão e interesse industrial (Halling e Kvittingen, 1999).

Os trabalhos de Zacks e Klibanov (1985, 1986, e 1988) e Klibanov (1986) foram ao encontro das necessidades da indústria na demanda de catalisadores mais activos e selectivos para processos de síntese química. Segundo Klibanov, a revolução tecnológica ocorrida na década de 80, em que se assistiu ao aparecimento de novas tecnologias aliadas à necessidade de novos produtos, mais concretamente de compostos enantiomericamente enriquecidos, levou a que a biocatálise em meios não aquosos seja nos dias de hoje uma das áreas com maior interesse científico e comercial (Halling e Kvittingen, 1999).

Este tipo de meios é designado por meios não convencionais. São caracterizados por possuírem uma quantidade de água disponível reduzida, comparativamente aos meios ditos convencionais (soluções aquosas), e compreendem solventes tão diversos como

solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou sólidas e líquidos iónicos (Cabral et al., 2003).

Uma das principais descobertas foi a de que, na presença de uma quantidade de água disponível muito reduzida, uma enzima adquire uma estrutura rígida que lhe permite obter a estabilidade necessária para realizar processos catalíticos. Deste modo, a enzima conserva a sua estrutura nativa em solventes orgânicos virtualmente secos (Almarsson e Klibanov, 1995; Klibanov, 2001).

Estes estudos tiveram um grande impacto na indústria, tendo-se observado um grande aumento no interesse pela utilização de enzimas em solventes orgânicos (Jaeger e Eggert, 2002), até porque muitas reacções de interesse comercial envolvem compostos hidrofóbicos a que corresponde uma produtividade volumétrica reduzida em sistemas aquosos (Schmid et al., 2001).

Sendo aceite que as enzimas exibem um comportamento diferente em solventes orgânicos em comparação com a água, será importante analisar quais as vantagens e desvantagens da utilização de solventes orgânicos em biocatálise.

Podem-se destacar algumas vantagens dos meios não convencionais (Cabral et al., 2003; Dordick, 1989):

- ✓ Maior solubilização de substratos e/ou produtos hidrófobos, permitindo assim o desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada;
- ✓ Recuperação facilitada dos produtos e de enzima da reacção, devido ao baixo ponto de ebulição dos solventes;
- ✓ Possibilidade de realizar reacções que são termodinamicamente desfavoráveis em água. No caso das hidrolases, que catalisam em meio aquoso reacções de hidrólise, consegue-se, através do controlo da actividade da água, favorecer a reacção inversa (de síntese). O equilíbrio da reacção pode, igualmente, ser deslocado no sentido da formação do produto mediante a remoção contínua deste;
- ✓ Redução de possíveis efeitos inibitórios e/ou tóxicos por parte do substrato e/ou produto. O solvente pode ser seleccionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial e na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos;



- ✓ Maior estabilidade da enzima; a estabilidade da enzima está directamente relacionada com a baixa actividade da água no meio, uma vez que a reacção de desnaturação requer água. Na desnaturação é necessário que as enzimas tenham alguma mobilidade, que é conferida pela água. Assim sendo, o processo de desnaturação é difícil em meios não aquosos;
- ✓ Estratégias de imobilização facilitadas; em meios não aquosos as enzimas não desorvem facilmente dos suportes;
- ✓ Diminuição do risco de contaminação microbiana;
- ✓ Controlo da estereoespecificidade das enzimas, uma vez que a rigidez estrutural conferida às enzimas pelos meios não-aquosos pode afectar as interacções enzima-substrato;
- ✓ Fácil recuperação do biocatalisador. Verifica-se nos casos em que a enzima constitui uma fase separada.

Das desvantagens em meios não convencionais podem-se destacar (Cabral et al., 2003; Dordick, 1989):

- ✓ Toxicidade de alguns solventes;
- ✓ Aumento das limitações difusionais à transferência de massa de substratos e/ou produtos, uma vez que se introduz mais uma fase (orgânica) além da fase aquosa (e uma fase sólida se o biocatalisador estiver imobilizado);
- ✓ Baixas actividades enzimáticas relativamente a meios aquosos.

Nos últimos anos, têm surgido diversos meios alternativos aos solventes orgânicos de entre os quais se destacam os líquidos iónicos e os fluidos supercríticos.

Os líquidos iónicos, compostos que consistem unicamente em iões mas se encontram no estado líquido à temperatura ambiente, atraíram a atenção como “solventes verdes”, sendo mesmo considerados como o meio reaccional do futuro (Cantone et al., 2007; Poliakoff et al., 2002). Este facto deve-se essencialmente aos líquidos iónicos possuírem uma pressão de vapor desprezável, bem como ao facto de propriedades como polaridade, hidrofiliicidade e miscibilidade poderem facilmente ser ajustadas através da conjugação do par catião/anião. Devido a esta última característica, os líquidos iónicos são geralmente designados de “designer solvents” (van Rantwijk et al., 2003).

Existem várias enzimas que têm sido testadas em sistemas reaccionais utilizando os líquidos iónicos como solventes. A maioria são lipases e pode-se destacar a *Candida*

*antarctica* (Novozym 435) como uma dessas enzimas. Reacções de transesterificação, em que a enzima foi várias vezes reutilizada sem perder a enantioselectividade e reactividade (Itoh et al., 2001), e o aumento da velocidade da reacção (Marcilla et al., 2006) são alguns dos exemplos estudados neste tipo de solventes.

### **Biocatálise em Fluidos Supercríticos**

A utilização de fluidos supercríticos em reacções catalisadas por enzimas foi primeiro descrita na década de 80 do século XX por Randolph et al. (1985), Hammond et al. (1985) e Nakamura et al. (1986), e esta área tem estado em expansão desde essa altura. A facilidade de manipulação das propriedades físicas do solvente através da simples alteração da pressão ou da temperatura é uma propriedade única dos sistemas supercríticos (Mesiano et al., 1999).

O fluido supercrítico mais popular é o dióxido de carbono, pois possui uma baixa toxicidade, alta disponibilidade e existe na natureza. É também de salientar o facto da sua temperatura crítica ser baixa (Tabela 1.1) comparativamente com outros solventes e estar bastante próxima da temperatura ambiente, o que representa uma vantagem no uso de enzimas como catalisadores. O dióxido de carbono foi encarado como a solução ideal para algumas aplicações comerciais. No entanto, há muitos compostos que não são solúveis em dióxido de carbono, o que limitou o campo de aplicações deste solvente. Apesar disso, a possibilidade de combinar catalisadores naturais com solventes naturais tem sido o grande motor de motivação para o avanço dos estudos nesta área (Mesiano et al., 1999; Lozano et al., 2004).

A utilização de enzimas em meios não aquosos veio indiscutivelmente abrir um novo campo de possibilidades para a aplicação de enzimas em processos biossintéticos não só através do aumento do tipo de reacções catalisadas, mas fundamentalmente na obtenção de produtos de maior valor acrescentado (Farina et al., 2001).

O estado supercrítico ocorre quando uma substância se encontra em condições de pressão e temperatura acima dos valores críticos respectivos (Figura 1.4). A temperaturas superiores à temperatura crítica, a forma gasosa da substância não pode ser liquefeita por maior que seja a pressão aplicada, essencialmente devido ao movimento molecular intenso que impede um balanço positivo favorável das atracções intermoleculares necessárias à formação de um líquido.

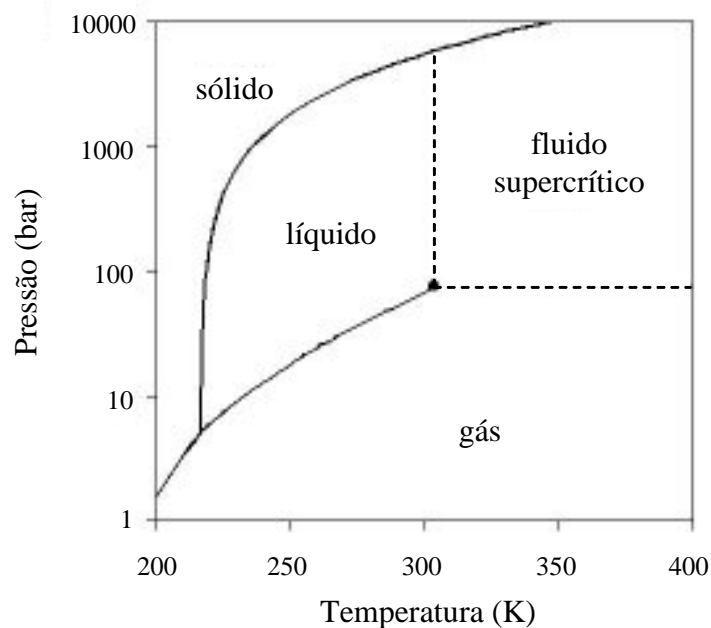


Figura 1.4: Diagrama de fases do CO<sub>2</sub>.

Na Tabela 1.1 encontram-se as temperaturas e pressões críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos.

Tabela 1.1: Temperatura e pressão críticas de algumas substâncias utilizadas como solventes supercríticos (Smith et al., 2005).

Solvente	T <sub>c</sub> (°C)	P <sub>c</sub> (bar)
Dióxido de Carbono	31,1	73,8
Etano	32,3	48,8
Propano	96,7	42,5
Etanol	243,1	63,8
Água	374,2	220,5

## Ésteres

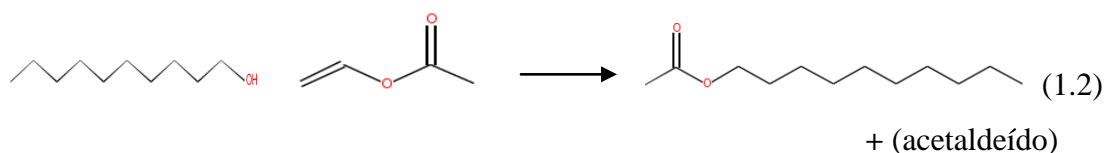
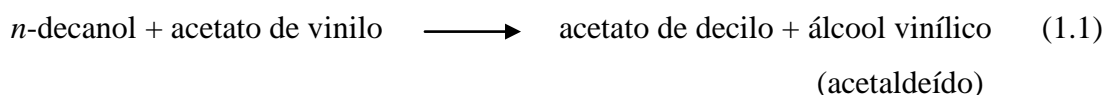
Os ésteres são compostos comuns na natureza. Podem-se encontrar nos óleos e gorduras, nas essências de frutas, flores e madeira, entre outras. São encontrados em muitos alimentos, perfumes, objectos e fármacos que se usam diariamente. Também são usados na produção de sabões e biocombustíveis, esta última área em crescente desenvolvimento (Yadav e Trivedi, 2003).

Um éster amplamente usado na indústria de fragrâncias devido à sua essência floral é o acetato de decilo. Além de figurar na lista da “Food and Drug Administration” como aromatizante autorizado (The Good Scents Company, 2007), como se encontra na natureza em óleos dispendiosos e em quantidades reduzidas (Essential Oils, 2007), o desenvolvimento de processos alternativos para a sua produção é extremamente vantajoso.

Tipicamente, este tipo de ésteres é obtido por extracção de óleos e ceras naturais (ésteres naturais) ou produzido pela esterificação de ácidos carboxílicos (ésteres sintéticos), com recurso a catalisadores ácidos e remoção de pelo menos um dos produtos, éster ou água, do meio reaccional de modo a deslocar o equilíbrio químico no sentido da produção do éster (Chiang et al., 2002; Riemenschneider, 2005).

Em termos científicos, é um bom composto modelo para o estudo da produção de um grupo alargado de ésteres de cadeia longa, igualmente aplicáveis nas indústrias de fragrâncias e cosmética, possibilitando uma boa abordagem a este tipo de processos.

O acetato de decilo é sintetizado pela reacção entre o *n*-decanol e o acetato de vinilo (equações 1.1 e 1.2):



O outro produto da reacção, o álcool vinílico, é tautomerizado imediata e irreversivelmente a acetaldeído.

A síntese deste éster é normalmente descrita através do mecanismo Ping-pong bi-bi, apresentado anteriormente. Fazendo referência à Figura 1.3, o acetato de vinilo é o substrato A, o decanol o substrato B, o acetato de decilo é o produto Q e o álcool vinílico é o produto P.

Embora existam já alguns exemplos de reacções de esterificação (ou transesterificação) catalisadas por enzimas, a consolidação da sua implementação a nível industrial encontra-se limitada, de uma forma geral, pelo preço da enzima (Gandhi et al., 2000).

A síntese destes ésteres em fluidos supercríticos apresenta-se como uma alternativa promissora aos solventes orgânicos convencionais. Para além dos benefícios ambientais que decorrem da substituição de solventes orgânicos por solventes naturais (p.e. CO<sub>2</sub>), os fluidos supercríticos apresentam uma série de vantagens, como menor resistência à transferência de massa, a possibilidade de ajustar o seu poder solvente através de pequenas alterações de temperatura e pressão, a eliminação de resíduos de solvente nos produtos finais e a simplificação da purificação dos produtos.

A possibilidade de aliar duas tecnologias sustentáveis – biocatálise e a tecnologia supercrítica recorrendo a solventes verdes/naturais - permite criar processos sem custos ambientais, e cujos produtos são considerados naturais, resultando num aumento significativo do seu valor no mercado.



## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Catalisador

O catalisador biológico utilizado neste trabalho foi a enzima lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada na resina macroporosa Lewatit B, conhecida comercialmente por Novozym 435®, gentilmente cedida pela Novozymes (Dinamarca).

O catalisador foi separado por diferentes tamanhos de partícula, fazendo-o passar através de peneiros com diferente abertura de malha. A equivalência em termos de tamanho de abertura de malha e diâmetro é apresentada na Tabela 2.1:

*Tabela 2.1: Tamanhos de partícula do catalisador.*

Grupo	MESH	Diâmetro (µm)
30	> 30	> 598
40	35 - 40	425 – 500
50	45 - 50	297 – 350
60	50 - 60	250 - 297

### 2.2 Reagentes e padrões

O reactor foi alimentado com decanol, acetato de vinilo, ambos da Aldrich (99% de pureza), decano (98% de pureza, da Fluka) e CO<sub>2</sub> (N45, da Air Liquide). Para a calibração do cromatógrafo utilizou-se ainda acetato de decilo (98% de pureza, da Alfa Aesar) e n-hexano (99% de pureza da Riedel – de Haën).

Para o método de Lowry utilizou-se carbonato de sódio anidro da Fluka, tartarato de sódio e potássio da Riedel-de Haën, sulfato de cobre pentahidratado da Riedel-de Haën, hidróxido de sódio da Pronolab, reagente de Folin-Ciocalteu da Merck e BSA (albumina sérica bovina) da SigmaDiagnostics.

### 2.3 Determinação do conteúdo enzimático – método de Lowry

Determinou-se, para os vários tamanhos de partícula, a quantidade de enzima imobilizada utilizando o método de Lowry (Lowry et al., 1951).

Tendo em conta que a enzima se encontra imobilizada, é necessário proceder-se inicialmente à sua dessorção para que fique em solução, uma vez que é nesta forma que é quantificada pelo método de Lowry.

Para a obtenção da enzima em solução o procedimento é descrito a seguir:

Pesam-se aproximadamente 5 mg de partículas dos diferentes tamanhos para *ependorfs*; adiciona-se a cada um 1 mL de solução NaOH 1 M; de seguida os *ependorfs* são colocados num banho a 100 °C, durante 10 minutos, tendo o cuidado de previamente furar as tampas dos *ependorfs*; após esse período colocam-se os *ependorfs* de imediato num banho de gelo, onde permanecem durante 5 minutos; leva-se ao vortex durante 5 segundos, centrifugando-se de seguida a 5400 r.p.m. durante 10 minutos; retiram-se, para novos *ependorfs*, 200 µL de sobrenadante (neste encontra-se a CALB que estava anteriormente adsorvida); procede-se ainda a uma diluição de 1:10, ou seja, retiram-se 100 µL do sobrenadante para um novo *ependorf*, juntam-se 900 µL de água destilada e desses 1000 µL resultantes retiram-se 200 µL.

Uma vez a enzima em solução, procedeu-se à sua quantificação pelo método de Lowry. Este método tem como base o facto do reagente de Folin-Ciocalteu ser reduzido pelas proteínas em solução alcalina, predominantemente pelos resíduos de tirosina e triptofano, formando um complexo cobre-proteína de cor azul com um máximo de absorção a 745-750 nm. O cobre liga-se à proteína e facilita a transferência de electrões para o reagente de Folin-Ciocalteu, particularmente na vizinhança de grupos funcionais aromáticos (como anéis de tirosina e triptofano).

Prepararam-se as seguintes soluções:

- Solução A – 3 g de carbonato de sódio anidro + 0,4 g de NaOH, em 100 mL de água destilada.
- Solução 2 – Solução aquosa de tartarato de sódio e potássio a 4 % (m/v).
- Solução 3 – Solução aquosa de sulfato de cobre pentahidratado a 2% (m/v).
- Reagente de Lowry – 0,25 mL de Solução 2 + 0,25 mL de Solução 3, perfazendo até 25 mL com Solução A. A adição da Solução 2 deverá ocorrer primeiro para evitar a precipitação de cobre e aumentar a estabilidade da solução. Além de alcalinizar o meio, a adição da solução A tem também como objectivo ajudar a desnaturar a proteína.



- Solução Padrão de BSA a 200 µg/mL. Os padrões para a calibração do espectrofotómetro (modelo DU 800, da Beckman Coulter) foram preparados por diluição desta solução de BSA (20, 50, 100, 150 e 200 µg/mL).

Aos 200 µL de sobrenadante obtidos conforme descrito anteriormente, adiciona-se, com agitação, 1 mL do Reagente de Lowry, espera-se 10 minutos e juntam-se 200 µL de reagente de Folin-Ciocalteu. Entre cada adição, as amostras são agitadas no vortex durante cerca de 5 segundos. Ao fim de 30 minutos é medida a absorvância a 750 nm. O branco é preparado da mesma forma mas com 200 µL de água em vez de amostra. O mesmo procedimento é aplicado aos padrões de BSA preparados para calibrar o espectrofotómetro. Todas as determinações foram feitas em duplicado.

## 2.4 Método de análise da mistura reaccional

A mistura reaccional foi analisada por cromatografia gasosa. Usou-se um cromatógrafo de gás, GC, da marca Thermo Quest, modelo Trace 2000, equipado com um detector de ionização de chama, FID, e um amostrador automático.

A separação dos compostos foi feita numa coluna quiral da BGB Analytik AG, modelo BGB – 178, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, revestida com um filme de 0,25 µm de espessura<sup>1</sup>.

O programa de temperatura usado tem duas rampas, sendo a primeira de 4 °C por minuto, iniciando a 80 °C e terminando aos 150 °C; a segunda rampa é de 6 °C por minuto, terminando aos 170 °C. O gás de arraste utilizado foi hélio N50, a um caudal de 2 mL/min. O injectoer encontra-se a 250 °C, assim como o detector. Nestas condições, os tempos de retenção foram de, aproximadamente, 6,5 min para o decano, 16 min para o decanol e 19 min para o acetato de decilo. O n-hexano e o acetato de vinilo saem simultaneamente, cerca dos 2,5 minutos.

Na Figura 2.1 encontra-se um cromatograma a título de exemplo.

---

<sup>1</sup> 20 % 2,3 – diethyl – 6 – tert – butyldimethylsilyl – beta – cyclodextrin dissolved in BGB – 15 (15 % phenyl -, 85 % methylpolysiloxane)

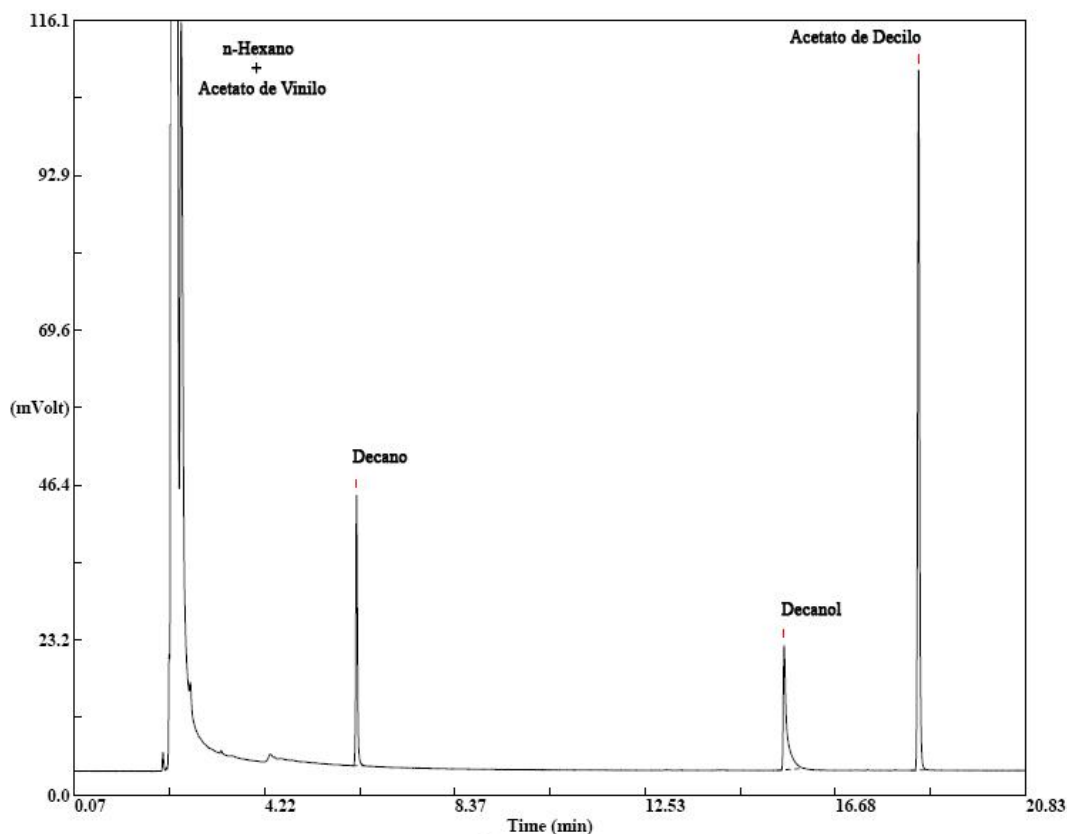


Figura 2.1: Exemplo de um cromatograma da mistura reaccional.

#### 2.4.1 Calibração do cromatógrafo

Na calibração do cromatógrafo recorreu-se ao método do padrão interno. Este método permite uma normalização dos resultados obtidos, eliminando potenciais variações no volume de amostragem. O padrão interno seleccionado foi o n-decano. Uma vez que este composto não entra na reacção, consegue-se ter sempre uma correlação directa de áreas. As áreas dos compostos a quantificar são divididas pela área do n-decano, uma vez que este funciona como um factor de resposta constante.

Uma vez que, com a coluna e as condições referidas anteriormente, não é possível separar o n-hexano do acetato de vinilo, optou-se por seguir o avanço da reacção através da quantificação de apenas um dos reagentes – o decanol – e um dos produtos – o acetato de decilo.

Foram preparados vários padrões com concentrações de decanol e de acetato de decilo representativas das condições experimentais esperadas nos estudos em reactor fechado, de acordo com a Tabela 2.2.

*Tabela 2.2: Concentrações pretendidas e massas pesadas dos compostos utilizados na preparação dos padrões.*

<b>Padrão</b>	<b>[Decanol] (mM)</b>	<b>[Ac. Decilo] (mM)</b>	<b>Massa pesada (g) (decanol)</b>	<b>Massa pesada (g) (Ac. Decilo)</b>
1	0	10	-	0,0210
2	10	0	0,0223	-
3	25	10	0,0413	0,0228
4	50	25	0,1043	0,0486
5	100	50	0,1543	0,0982
6	150	75	0,2441	0,1451
7	200	100	0,3215	0,1912

Os padrões foram preparados num balão volumétrico de 10 mL. Inicialmente tarou-se o balão e colocou-se a quantidade correspondente à concentração pretendida de um dos compostos da mistura, pesou-se e voltou-se a repetir o mesmo processo para o outro composto, perfazendo-se depois o volume do balão com uma solução 20 mM de decano em hexano. Esta solução de decano foi preparada num balão de 100 mL, repetindo-se o mesmo processo: tarou-se o balão, pipetou-se a quantidade correspondente aos 20 mM, pesou-se e fez-se o volume com hexano.

## 2.5 Instalação Experimental

Após a selecção de todo o material necessário, procedeu-se à montagem da instalação para os estudos em reactor fechado onde foi levado a cabo todo o estudo experimental. O equipamento consiste num reactor de volume variável em aço inox, equipado com uma janela de safira e um sistema de alimentação e recolha de amostras (Figuras 2.2 e 2.4). Durante os estudos experimentais, o reactor foi termostatizado a 35 °C através de um banho de água, e pressurizado a 100 bar com CO<sub>2</sub>.

Nas Figuras 2.3 e 2.5 está representado em pormenor o reactor de volume variável.

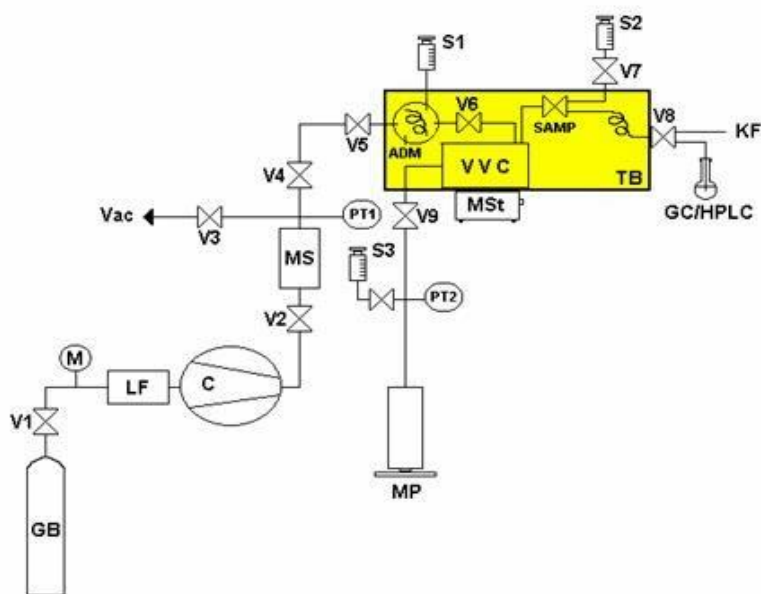


Figura 2.2: Esquema da instalação experimental usada nas reacções em reactor fechado:

GB – gás ( $\text{CO}_2$ ); V - válvulas; M - medidor de pressão; LF - filtro; C - compressor; MS - peneiros moleculares; S1 - adição de reagentes; S2 - adição de solvente de lavagem; S3 - adição de água; PT – transdutores de pressão; MP – bomba manual de água; ADM – válvula cromatográfica; VVC – reactor; MSt – placa de agitação; SAMP – válvula de amostragem (3 vias); TB – banho de água termostaticado.

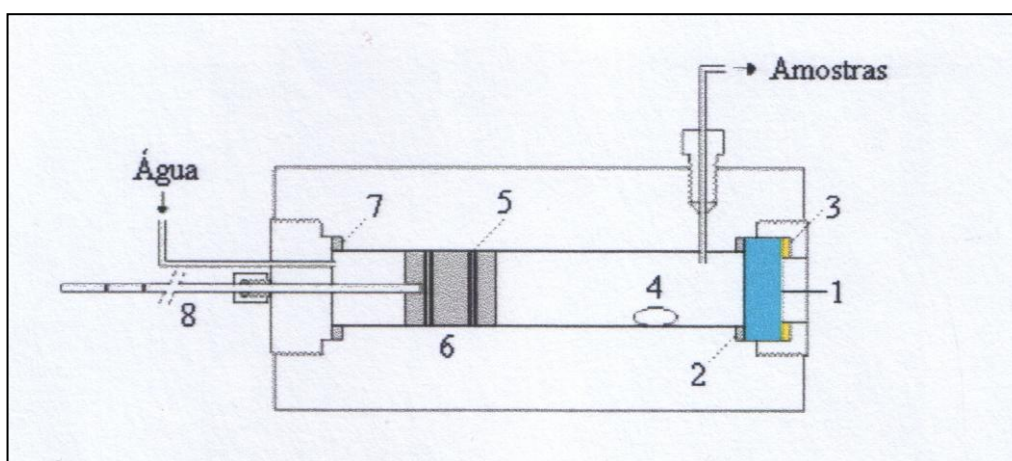
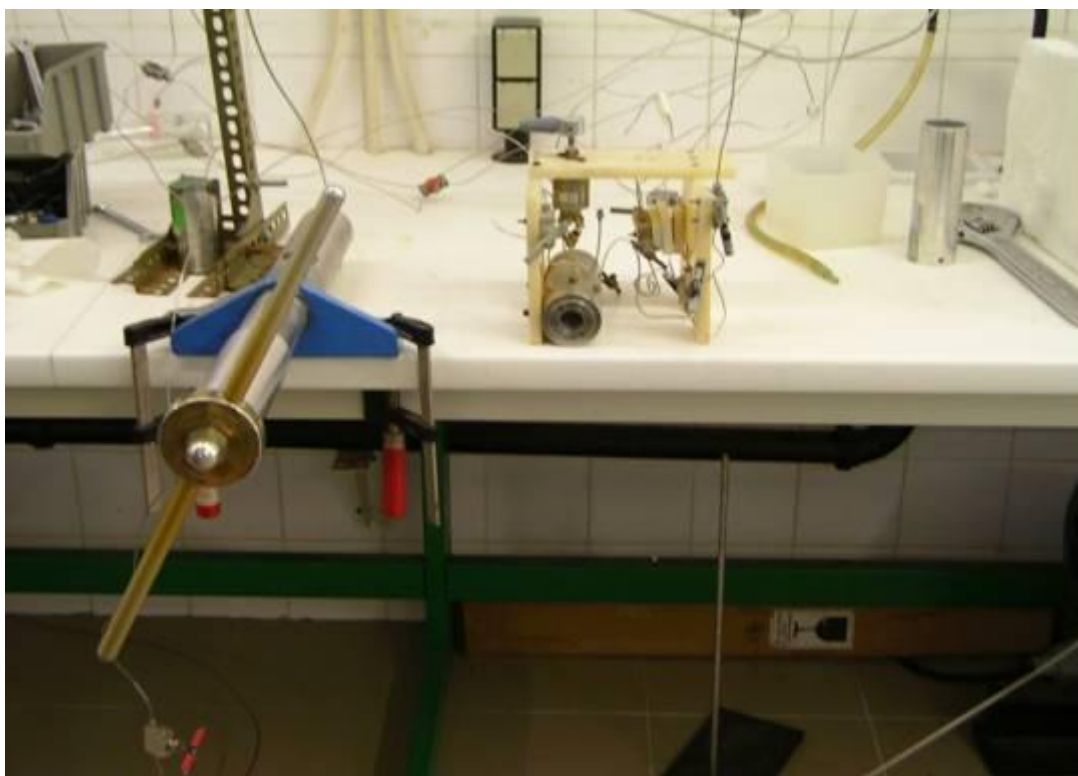


Figura 2.3: Reactor de volume variável:

1 – Janela de safira; 2 – Anel de teflon; 3 – Anel de ertacetal; 4 – Agitador magnético; 5 – O-rings; 6 – Êmbolo de teflon; 7 – Anel de teflon; 8 – Pistão.



*Figura 2.4: Instalação experimental usada nas reacções em reactor fechado.*



*Figura 2.5: Reactor de volume variável.*

A janela de safira que o reactor possui permite visualizar a reacção no seu interior; o facto do reactor ser de volume variável possibilita a reposição da pressão após a recolha

de cada amostra, sem ser necessária a adição de fluido ( $\text{CO}_2$ ) com a consequente diluição da mistura reaccional.

## 2.6 Técnica experimental

### 2.6.1 Modo de operação de uma experiência em reactor fechado

A realização de uma experiência envolve vários passos que se podem resumir nas seguintes etapas:

1. Preparação do reactor.
2. Primeira fase de alimentação.
3. Pressurização do sistema.
4. Segunda fase de alimentação.
5. Amostragem.
6. Análise.

De seguida apresenta-se uma descrição detalhada de cada uma destas etapas:

#### 1. Preparação do reactor

Inicialmente introduz-se o êmbolo no reactor, tendo-se o cuidado de colocar os *o-rings*. Fecha-se a parte de trás do reactor (lado esquerdo da Figura 2.3) com a tampa respectiva, também de aço inox. O anel de *teflon* (7 da Figura 2.3), colocado para evitar o contacto directo entre as superfícies de aço inox da tampa e do interior do reactor, é sempre substituído no início de cada experiência. Fecham-se as válvulas V5 a V9.

#### 2. Primeira fase de alimentação

Coloca-se dentro do reactor um determinado volume de decanol (consoante a concentração pretendida para este composto na alimentação), decano (foi usado um volume fixo de 85,8  $\mu\text{L}$  para todas as reacções, o que corresponderá a uma concentração 20 mM dentro do reactor), a enzima imobilizada (a quantidade também varia consoante o tamanho de partícula usado) e uma barra de agitação magnética, revestida de *teflon*, de maneira a assegurar uma boa agitação dentro do reactor sem, no entanto, partir as partículas. Coloca-se o anel de *teflon* (2 da Figura 2.3), a janela de safira e depois fecha-se a parte

da frente do reactor (lado direito da Figura 2.3) com a tampa respectiva. Coloca-se o conjunto reactor + *loops* num banho a 35 °C. O controlo da temperatura é feito por um termostato de imersão.

### 3. Pressurização do sistema

Ligam-se as linhas de introdução de água e de solvente (CO<sub>2</sub>), através da manipulação das válvulas V9 e V5. Abre-se a válvula V9 para permitir a entrada de água na linha e começa-se a girar a bomba de água (gerador de alta pressão, modelo 62-6-10, da High Pressure Equipment Company – HIP) até à posição correspondente ao volume útil pretendido para o reactor (22 cm<sup>3</sup>). Com V5 fechada, abre-se a garrafa de CO<sub>2</sub> e faz-se a sua compressão para a linha até cerca de 180 bar, com recurso ao compressor. Abre-se V5 e V6, permitindo assim a entrada de CO<sub>2</sub> no reactor. Esta entrada de CO<sub>2</sub> no reactor provoca um recuo do êmbolo, havendo assim um aumento do volume do reactor. De forma a repor o volume pretendido (22 cm<sup>3</sup>), volta-se a permitir a entrada de água na linha fazendo girar a bomba até o êmbolo ficar na posição correcta. Repete-se várias vezes o processo até se obter a pressão desejada no interior do reactor (100 bar). Deixa-se o sistema estabilizar durante alguns minutos.

É colocada uma placa de agitação por baixo do banho de termostatização para, em conjunto com a barra de agitação magnética, promover a agitação dentro do reactor.

### 4. Segunda fase de alimentação

Assim que o equilíbrio é atingido, efectua-se a adição do segundo reagente, o acetato de vinilo (S1 da Figura 2.2). Abre-se a válvula cromatográfica (ADM), enchendo-se assim o *loop*. São usados *loops* de diferentes volumes, conforme a concentração pretendida para este composto na alimentação. Fecha-se ADM de imediato. Com V5 e V6 fechadas, torna-se a comprimir o CO<sub>2</sub> para a linha. Abrem-se V5 e V6, sendo desta forma o acetato de vinilo arrastado para o interior do reactor (instante zero da reacção). Repõe-se de imediato a posição do êmbolo.

### 5. Amostragem

Pára-se a agitação. Abre-se a válvula SAMP (entre VVC e V8) e a amostra entra num *loop* de 200 µL. Fecha-se SAMP e de imediato reinicia-se a

agitação. Abre-se V8 e o conteúdo do *loop* é recolhido para um *eppendorf* já com 400  $\mu\text{L}$  de hexano. A amostra começa a borbulhar no hexano. De seguida, abrem-se as válvulas V7 e SAMP (entre V7 e V8) e o *loop* e a zona de expansão são lavados com 800  $\mu\text{L}$  do mesmo solvente (hexano), sendo também recolhidos para o mesmo *eppendorf*. Fecham-se todas as válvulas.

## 6. Análise

Retira-se cerca de 1 mL da amostra recolhida no *eppendorf* para um *vial* de 2 mL de capacidade e analisa-se de imediato, recorrendo-se ao amostrador automático do cromatógrafo de gás.



### 3. RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO

#### 3.1 Curvas de calibração

##### 3.1.1 Espectrofotómetro

Na Figura 3.1 está representada a curva de calibração do espectrofotómetro, onde se representa a concentração mássica de proteína nos padrões de BSA em função da absorvância a 750 nm.

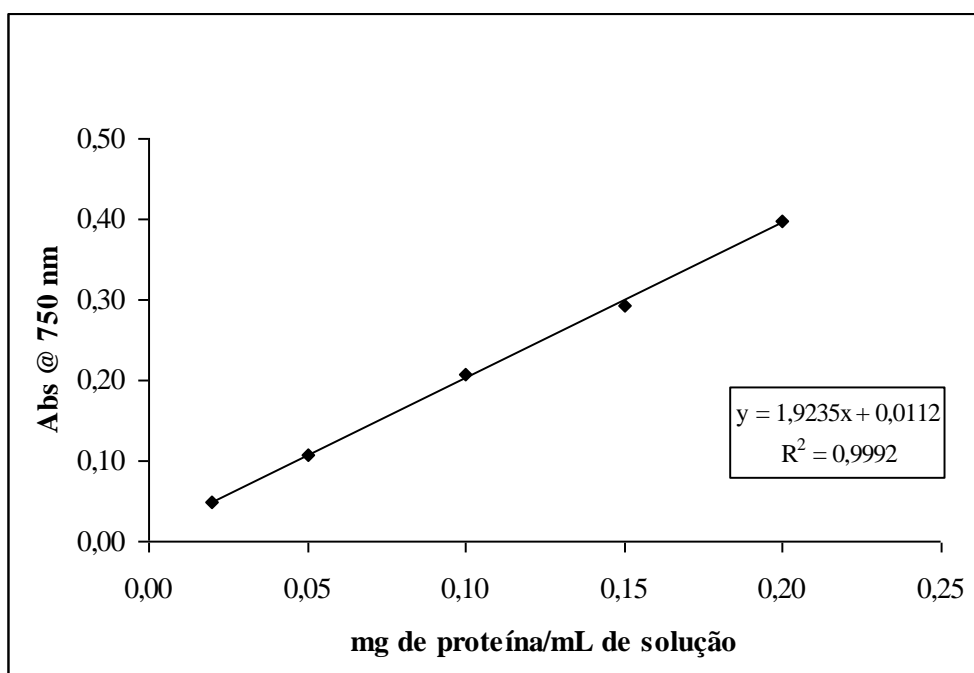


Figura 3.1: Curva de calibração do espectrofotómetro.

A relação absorvância vs. concentração mássica de proteína é linear em toda a gama de trabalho.

##### 3.1.2 Cromatógrafo de gás (método do padrão interno)

Na Tabela 3.1 encontram-se as concentrações dos padrões usados e as áreas dos picos cromatográficos obtidas na calibração do cromatógrafo.

Tabela 3.1: Concentrações dos padrões e áreas obtidas na calibração do cromatógrafo.

Padrão	Concentração (mM)			Área		
	Decanol	Acetato de decilo	Decano	Decanol	Acetato de decilo	Decano
1	-	10,03	20	-	4180324	8073640
2	14,09	-		6630277	-	6189161
3	26,09	11,38		9599817	4175061	8138722
4	65,89	24,26		16453170	7109874	6187508
5	97,48	49,02		24102380	14047760	5626964
6	154,21	72,43		43899930	24232590	6335222
7	203,11	95,45		51901380	28346820	5910277

Nas Figuras 3.2 e 3.3 estão representadas as curvas de calibração obtidas para o decanol e para o acetato de decilo, respectivamente. As equações que são apresentadas foram obtidas obrigando as rectas a passar pela origem.

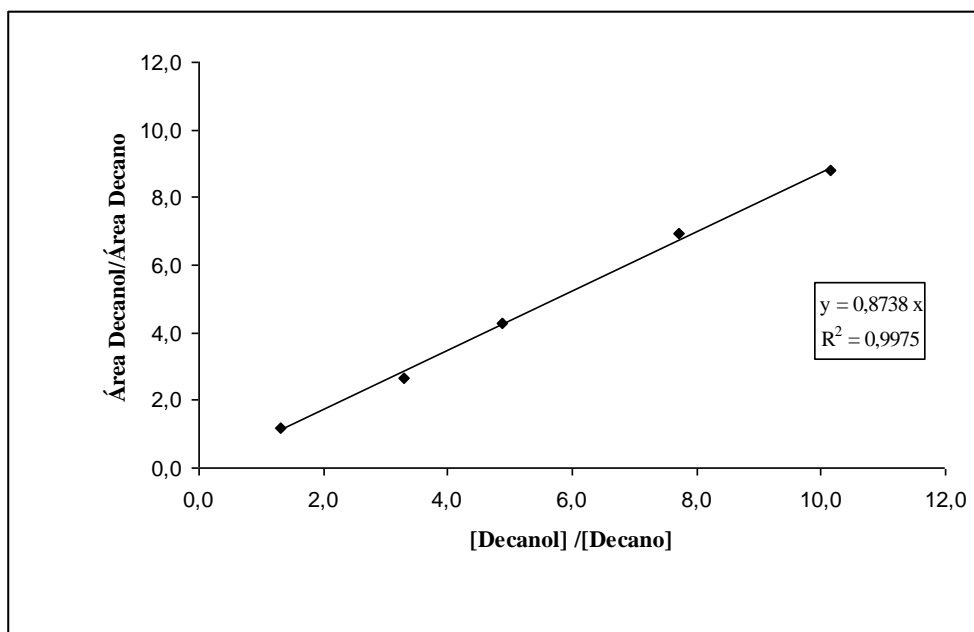


Figura 3.2: Curva de calibração obtida para o decanol.

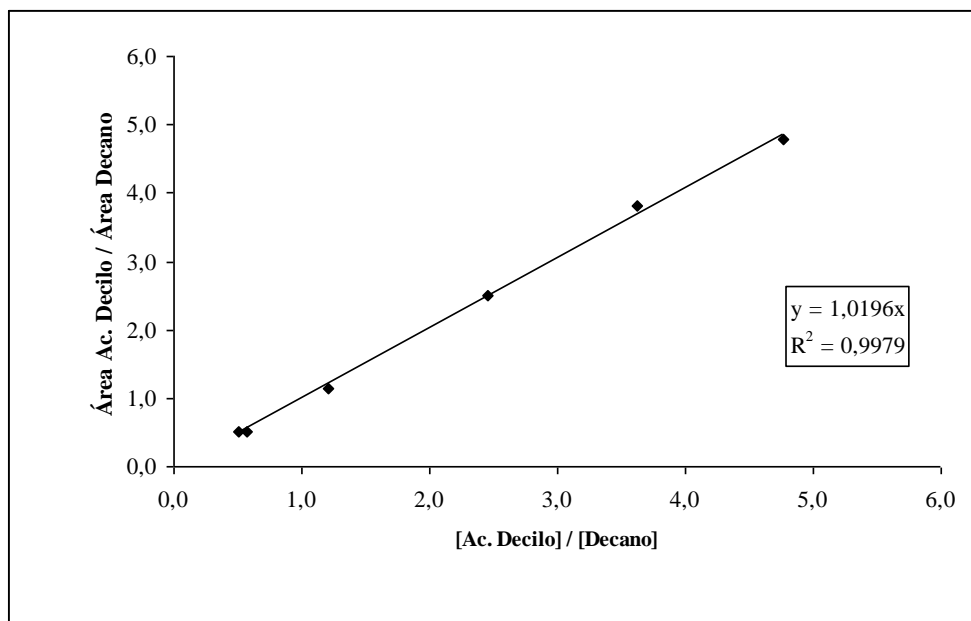


Figura 3.3: Curva de calibração obtida para o acetato de decilo.

A relação entre a razão das áreas e a razão das concentrações é linear em toda a gama de trabalho, tanto para o decanol como para o acetato de decilo.

### 3.2 Determinação do conteúdo enzimático das partículas de catalisador

Os resultados obtidos do conteúdo enzimático por tamanho de partícula encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Conteúdo enzimático para os diferentes tamanhos de partícula.

Grupo	MESH	Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Conteúdo enzimático (mg enzima /g partícula)
30	> 30	>598	54,09
40	35 - 40	425-500	61,94
50	45 - 50	297-350	84,13
60	50 - 60	250-297	89,18

Os valores obtidos para o conteúdo enzimático mostram que a quantidade específica de enzima (massa de enzima/massa de partícula) depende do tamanho de partícula: as partículas mais pequenas têm uma quantidade específica de enzima mais elevada que as

partículas maiores. Estudos experimentais feitos por Garcia-Alles e Gotor (1998) também evidenciam que a quantidade específica de enzima varia com o tamanho de partícula, sendo este valor maior para partículas mais pequenas. van Roon et al. (2003) referem uma correlação similar para a Penicilina-G Acilase imobilizada. Os autores referem que esta dependência da quantidade específica de enzima com o tamanho de partícula pode estar relacionada com limitações internas à transferência de massa durante o processo de imobilização.

Mais recentemente, Chen et al. (2007) verificaram também que, embora a quantidade específica máxima de enzima (saturação) seja independente do tamanho da partícula, as partículas mais pequenas são saturadas com enzima mais rapidamente.

Mei et al. (2003) verificaram que na Novozym 435 a enzima encontra-se localizada na camada exterior da partícula, com uma espessura de 80 a 100  $\mu\text{m}$  e distribuída de forma não uniforme. Referem ainda que parece não haver nenhuma barreira física que impossibilite a difusão da enzima para o interior da partícula, uma vez que o tamanho médio de poros da partícula é mais de dez vezes superior ao tamanho da molécula de CALB. Em estudos para controlar a espessura da camada exterior de enzima, os mesmos autores obtiveram partículas em que a enzima ficou distribuída por completo, ou seja, difundiu até ao centro, bastando para isso aumentar o tempo para a difusão e a concentração de CALB.

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho parecem indicar que realmente a enzima se encontra numa camada exterior da partícula, ou seja, seguindo um modelo do tipo “casca de ovo”. De facto, supondo uma distribuição uniforme de enzima nessa camada exterior, a espessura da camada será independente do tamanho da partícula uma vez que todas estão expostas ao mesmo tempo de difusão. É isso que se pretende ilustrar com a Figura 3.4: partículas de tamanho diferente mas com igual espessura de enzima:

$$R_1 - r_1 = R_2 - r_2 \quad (3.1)$$

$R_i$  representa o raio total da partícula e  $r_i$  o raio da partícula sem a camada de enzima.

Assim, será sempre possível explicitar o raio de uma partícula sem a camada de enzima a partir do conhecimento da espessura de enzima, por exemplo:

$$r_2 = R_2 - (R_1 - r_1) \quad (3.2)$$

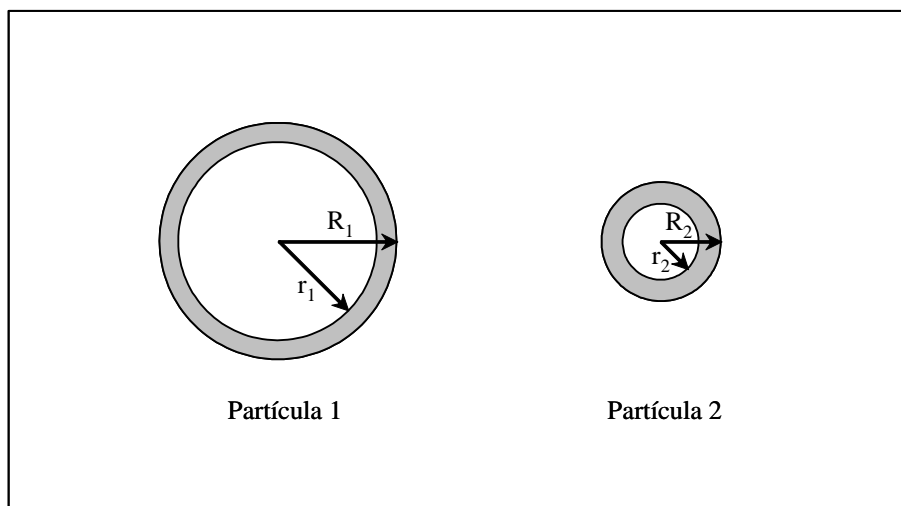


Figura 3.4: Representação esquemática de duas partículas de tamanhos diferentes de enzima imobilizada.

Sendo o volume de enzima de cada partícula,  $v_i^{enz}$ , dado por:

$$v_i^{enz} = \frac{4}{3} \pi (R_i^3 - r_i^3) \quad (3.3)$$

assumindo que a razão entre o volume e a massa de enzima,  $m_i^{enz}$ , em cada partícula é constante, usando os resultados da Tabela 3.2 e recorrendo à ferramenta *Solver* da *Microsoft Excel* obteve-se uma espessura de enzima de 60  $\mu\text{m}$ , com um erro médio de cerca de 3 %. Esta espessura é inferior à referida por Mei et al. (2003), como seria de esperar, pois o cálculo assume uma distribuição uniforme. Uma distribuição não uniforme implica, consequentemente, uma espessura superior.

No que diz respeito às experiências a realizar, tem que se ter em conta a quantidade de enzima usada e não a quantidade de partículas uma vez que, quando se usa a mesma quantidade de partículas catalíticas, na realidade as reacções estão a ser realizadas com diferentes quantidades de enzima. À medida que o tamanho de partícula diminui, a quantidade de enzima no reactor aumenta, contribuindo assim para um aumento da velocidade da reacção que não está relacionado directamente com a redução das limitações difusionais.

Assim, de forma a poder comparar correctamente os resultados, nas experiências realizadas foi usada uma quantidade de partículas correspondente à quantidade de enzima pretendida tendo em conta os resultados da Tabela 3.2.

### **3.3 Avaliação das resistências à transferência de massa**

Quando se trabalha com enzimas imobilizadas, assim como com qualquer outro catalisador suportado, os reagentes, para atingirem as moléculas de enzima, têm que primeiro difundir pelo fluido até à superfície das partículas, atravessar uma camada estagnante de fluido, e depois difundir dentro dos poros, onde a enzima está imobilizada.

A espessura da camada de filme pode ser geralmente reduzida pela agitação da mistura da reacção, minimizando, ou até eliminando, a influência deste fenómeno de transporte em todo o processo de reacção.

A influência da transferência interna de massa num determinado processo pode ser minimizada reduzindo o tamanho de partícula, e tornando assim mais pequeno o caminho da difusão. Quando partículas catalíticas de diferentes tamanhos estão disponíveis, estas podem ser usadas para avaliar a influência relacionada com a difusão interna em todo o processo. Quando limitações difusionais internas estão presentes, uma redução no tamanho de partícula conduz, geralmente, a um aumento da velocidade da reacção.

#### **3.3.1 Avaliação da resistência externa à transferência de massa**

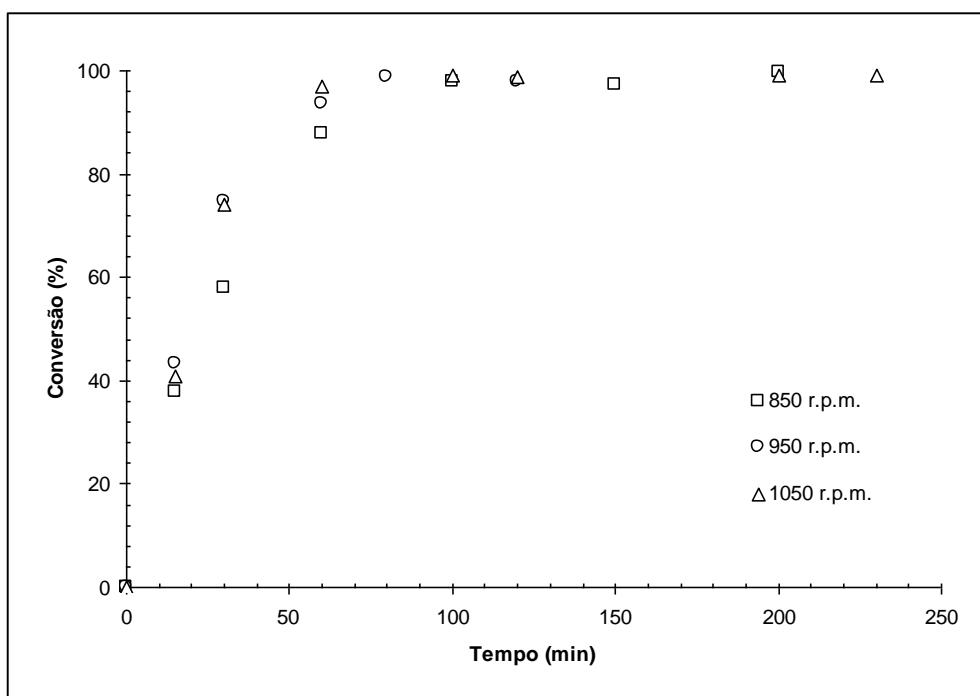
A avaliação da existência de resistências à difusão dos reagentes do meio reaccional para as partículas do catalisador foi realizada fazendo variar a velocidade de agitação dentro do reactor, mantendo todas as outras condições de operação constantes. Para viscosidades da ordem de grandeza das do CO<sub>2</sub> em condições supercríticas e velocidades de reacção típicas das reacções enzimáticas, as resistências externas são facilmente minimizadas através da agitação.

Realizaram-se três experiências com a mesma quantidade de catalisador, de igual tamanho de partícula (ou seja, com a mesma quantidade de enzima), a mesma alimentação, temperatura e pressão, mas utilizando agitações diferentes: 850 r.p.m., 950 r.p.m. e 1050 r.p.m. (Tabela 3.3).

*Tabela 3.3: Condições de operação das experiências para avaliação das resistências externas à transferência de massa.*

Velocidade de agitação (r.p.m.)	Catalisador		Alimentação		T (° C)	P (bar)
	MESH	Massa (g)	[Acetato de Vinilo] (mM)	[Decanol] (mM)		
850	40	0,0360	50	50	35	100
950						
1050						

Na Figura 3.5 está representada a conversão dos reagentes ao longo do tempo para as três experiências.



*Figura 3.5: Efeito da velocidade de agitação do reactor na conversão dos reagentes ao longo do tempo.*

Como se pode observar, a partir das 950 r.p.m. as resistências externas à transferência de massa são aparentemente eliminadas. Comparando as velocidades iniciais obtidas em cada experiência (Tabela 3.4), verifica-se que houve um aumento de 43.9 % quando a velocidade do agitador aumentou de 850 r.p.m. para 950 r.p.m. Entre as duas

experiências com velocidades de agitação superior (950 r.p.m. e 1050 r.p.m.) há uma diferença relativa de apenas 5 %, que se pode considerar pouco significativa, tendo em conta os erros associados à análise.

*Tabela 3.4: Velocidade inicial de reacção nas experiências com diferentes velocidades de agitação.*

Velocidade de agitação (r.p.m.)	Velocidade inicial ( $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$ enzima)
850	9,90
950	14,25
1050	13,50

Embora a agitação de 950 r.p.m. pareça suficiente, optou-se por realizar todas as experiências seguintes com uma agitação de 1050 r.p.m.

### 3.3.2 Avaliação da resistência interna à transferência de massa

No caso das resistências internas, realizaram-se experiências com diferentes tamanhos de partícula, mas com a mesma quantidade de enzima (2,2 mg), a mesma concentração dos dois substratos na alimentação, a mesma agitação, pressão e temperatura (Tabela 3.5).

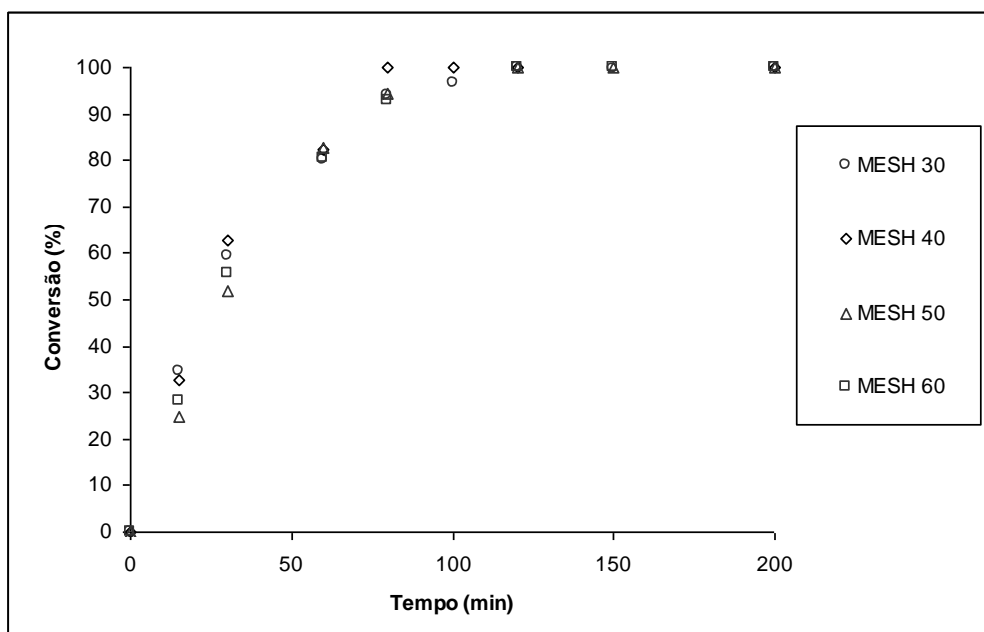
A conversão dos reagentes ao longo do tempo para as quatro experiências está representada na Figura 3.6.

Em condições de operação exactamente iguais, seria de esperar que as diferenças mais significativas fossem encontradas entre os resultados experimentais para os quais se usou o catalisador de maior e menor tamanho de partícula, ou seja, neste caso entre as experiências com partículas de MESH 30 e 60. No entanto, como se pode observar pelo gráfico da Figura 3.6, não é isso que se verifica, havendo até conversões superiores para os tamanhos de partícula maiores.



*Tabela 3.5: Condições de operação das experiências para avaliação das resistências internas à transferência de massa.*

Catalisador		Alimentação		Agitação (r.p.m.)	T (° C)	P (bar)
MESH	Massa (g)	[Acetato de vinilo] (mM)	[Decanol] (mM)			
30	0,0411	50	50	1050	35	100
40	0,0360	50	50			
50	0,0261	50	50			
60	0,0251	50	50			



*Figura 3.6: Efeito do tamanho de partícula do catalisador na conversão dos reagentes ao longo do tempo.*

A análise em termos de velocidade inicial da reacção poderá ser mais esclarecedora. Como mostram os resultados da Tabela 3.6, a diferença relativa máxima entre as velocidades iniciais é de apenas 4,5 % (experiências com MESH 40 e 50). Tendo em

conta os erros associados à análise, parece não haver influência significativa do tamanho das partículas do catalisador sobre a velocidade da reacção, pelo que se poderá usar qualquer um dos tamanhos sem que isso implique limitações difusionais no interior das partículas.

*Tabela 3.6: Velocidades iniciais da reacção nas experiências com diferente tamanho de partícula de catalisador.*

MESH	Velocidade inicial ( $\mu\text{mol}/\text{min.mg}$ enzima)
30	11,26
40	11,03
50	11,53
60	11,45

### 3.4 Avaliação do efeito da concentração dos substratos na alimentação

Realizaram-se várias experiências utilizando diferentes concentrações de decanol e de acetato de vinilo na alimentação, mantendo iguais todas as outras condições, de modo a avaliar o efeito daquela variável na velocidade inicial da reacção.

Na Tabela 3.7 estão registadas as condições em que foram realizadas as experiências. O primeiro grupo de experiências corresponde à alimentação com excesso de decanol, mantendo-se constante a concentração inicial de acetato de vinilo. O segundo grupo de experiências corresponde à situação inversa, ou seja, excesso de acetato de vinilo com concentração de decanol constante. Em todas as experiências foi usado catalisador de tamanho 40, numa quantidade equivalente a 2.2 mg de enzima, excepto em duas experiências – excesso de acetato de vinilo, 150 e 200 mM – em que se usou metade da quantidade (1.1 mg de enzima). Esta redução prendeu-se com o facto de nas condições destas experiências a velocidade reaccional ser superior, pelo que usando a mesma quantidade de catalisador a primeira amostra recolhida corresponderia a uma conversão muito elevada não permitindo uma comparação correcta em termos de velocidade inicial da reacção.

*Tabela 3.7: Condições das experiências com diferentes concentrações dos substratos na alimentação.*

	Alimentação		Catalisador		Agitação (r.p.m.)	T(° C)	P (bar)
	[Acetato de Vinilo] (mM)	[Decanol] (mM)	MESH	Massa (g)			
	50	50	40	0,0360			
Excesso de Decanol	50	75		0,0361	1050		
		100		0,0361	1050		
		150		0,0360	1050		
Excesso de Ac. Vinilo	100	50		0,0361	1050		
	150			0,0181	1050		
	200			0,0181	1050		

Na Figura 3.7 está representada a variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de decanol na alimentação para o primeiro grupo de experiências (excesso de decanol). Segundo os resultados obtidos, parece que para uma concentração de decanol na alimentação até 75 mM não há alteração significativa da velocidade inicial da reacção. No entanto, quando esse valor aumenta para 100 mM há uma diminuição da velocidade inicial de reacção de 17,8 % relativamente à alimentação equimolar. Essa diminuição ainda é mais acentuada (49,0 %) quando a concentração de decanol na alimentação passa para 150 mM.

Estes resultados indicam que a reacção é inibida pelo álcool quando este está presente em concentrações mais elevadas.

Na Figura 3.8 está representada a variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de acetato de vinilo na alimentação para o segundo grupo de experiências (excesso de acetato de vinilo). Os resultados mostram que a velocidade inicial da reacção aumenta significativamente (cerca de 83 %) quando a alimentação tem excesso de acetato de vinilo, sendo, no entanto, praticamente independente da concentração deste reagente desde que esta seja superior a 100 mM.

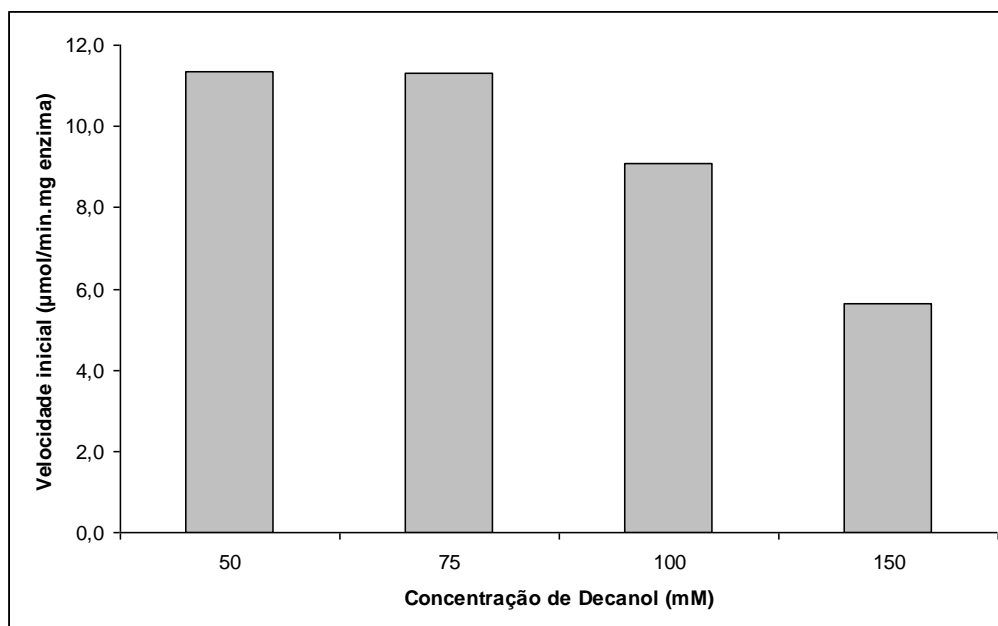


Figura 3.7: Variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de decanol na alimentação, mantendo a concentração inicial de acetato de vinilo constante.

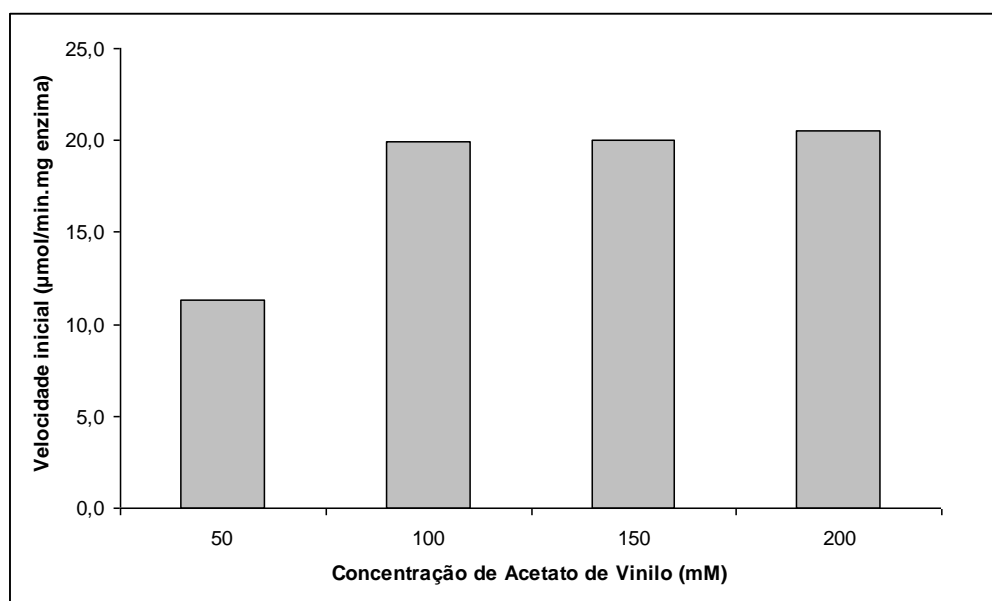


Figura 3.8: Variação da velocidade inicial da reacção em função da concentração de acetato de vinilo na alimentação, mantendo a concentração inicial de decanol constante.

As reacções enzimáticas de esterificação/transesterificação são normalmente descritas pelo mecanismo Ping-pong bi-bi com inibição competitiva por parte do álcool, que se traduz na seguinte equação de velocidade de reacção (Zhang et al., 2005; Yadav e Devi, 2004; Zhang et al., 2004; Yahya et al., 1998):

$$v = \frac{V_{max}}{\frac{K_{MA}}{[A]} \left( 1 + \frac{[B]}{K_I} \right) + \frac{K_{MB}}{[B]} + 1} \quad (3)$$

em que  $v$  representa a velocidade da reacção,  $[A]$  a concentração de acetato de vinilo,  $[B]$  a concentração de decanol,  $V_{max}$  a velocidade máxima da reacção,  $K_{Mi}$  a constante de Michaelis para o substrato  $i$  e  $K_I$  a constante de inibição competitiva.

Os resultados experimentais obtidos, tanto com excesso de decanol como com excesso de acetato de vinilo, são qualitativamente consistentes com este mecanismo, uma vez que a reacção é inibida por concentrações elevadas de decanol e acelerada por concentrações elevadas de acetato de vinilo.

### 3.5 Comparação das experiências em meio orgânico e meio supercrítico (CO<sub>2</sub>) para a produção de acetato de decilo

Os resultados obtidos em CO<sub>2</sub> supercrítico, sc-CO<sub>2</sub>, foram comparados com resultados obtidos em hexano por Ribeiro et al. (2006).

Observou-se que utilizando como solvente sc-CO<sub>2</sub> a reacção apresenta uma velocidade inicial significativamente mais baixa: cerca de 75 % para os tamanhos de partícula 40 e 50 e cerca de 86 % para o tamanho 60 (Figura 3.9).

Enquanto que em sc-CO<sub>2</sub> não há resistências internas à transferência de massa, em hexano elas existem: a velocidade inicial de reacção com partículas de catalisador de tamanho 60 é cerca de 45 % mais elevada do que para os tamanhos 40 e 50.

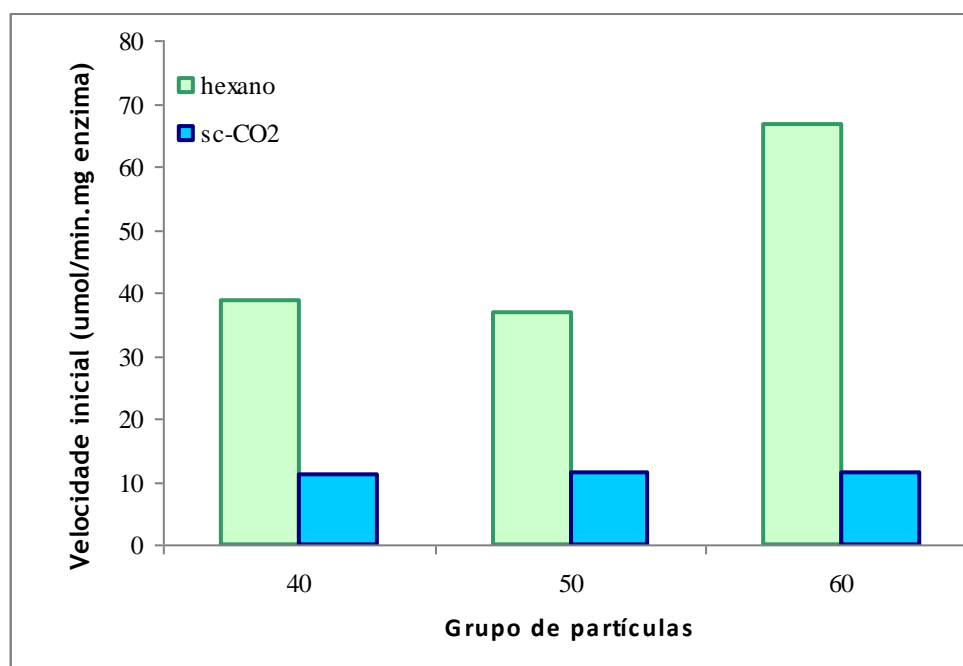


Figura 3.9: Variação da velocidade inicial da reacção em função dos diferentes tamanhos de partícula em  $\text{sc-CO}_2$  e em hexano.

#### 4. CONCLUSÕES

O estudo da reacção de transesterificação do acetato de vinilo com o decanol, em reactor fechado, usando como solvente CO<sub>2</sub> supercrítico e a Novozym 435 como catalisador, teve como principais objectivos a avaliação das resistências à transferência de massa e a determinação da influência da concentração dos substratos na alimentação sobre a velocidade da reacção. Foi também avaliado o conteúdo enzimático por tamanho de partícula de catalisador.

Verificou-se que, à medida que o tamanho de partícula diminui, a quantidade intrínseca de enzima aumenta. Pensa-se que este facto poderá estar relacionado com o facto da enzima estar localizada numa camada externa da partícula, seguindo um modelo tipo “casca de ovo”, e a espessura dessa camada de enzima ser independente do tamanho da partícula, isto é, ser igual para todos os tamanhos de partícula. A partir dos resultados experimentais do conteúdo enzimático por tamanho de partícula e assumindo uma distribuição uniforme de enzima, a espessura encontrada para a camada de enzima é de cerca de 60 µm.

Relativamente às resistências à transferência de massa, os resultados experimentais mostram que, nas condições de operação, estas não são significativas. As resistências externas foram facilmente eliminadas impondo uma agitação no reactor superior a 950 r.p.m. Para as resistências internas verificou-se que a velocidade inicial de reacção era praticamente a mesma para todos os tamanhos de partícula testados. Havendo limitações difusionais significativas, o tamanho de partícula mais pequeno seria o que apresentaria uma velocidade inicial consideravelmente mais elevada.

Na avaliação do efeito da concentração dos substratos na alimentação, observou-se que mantendo a concentração de acetato de vinilo constante e aumentando a de decanol, este actuava como inibidor da reacção, tendo em conta que a velocidade baixava consideravelmente (49% para uma concentração de decanol três vezes superior à estequiométrica). O contrário foi verificado utilizando acetato de vinilo em excesso, havendo um aumento significativo (cerca de 83 %) da velocidade inicial relativamente à alimentação equimolar. Observou-se ainda que a partir de uma concentração de acetato de vinilo duas vezes superior à estequiométrica, a velocidade inicial da reacção mantém-se praticamente constante.

Os resultados obtidos em meio supercrítico ( $\text{CO}_2$ ) foram comparados com os resultados em meio orgânico (hexano). Verificou-se que as reacções em  $\text{CO}_2$  supercrítico foram significativamente mais lentas (80 % em média) que em hexano, o que limitará a produtividade volumétrica de acetato de decilo em meio supercrítico. Contudo, a etapa de separação será muito mais fácil e, portanto, menos dispendiosa, usando  $\text{CO}_2$  como solvente. Esta questão poderá representar, no processo global de produção, uma grande vantagem.

Além da questão apontada relativamente à etapa de separação, há também que ter em conta a necessidade de reduzir os riscos ambientais. Também neste aspecto o recurso ao  $\text{CO}_2$  supercrítico poderá representar uma alternativa aos solventes orgânicos tradicionais, uma vez que, para além de apresentar uma baixa toxicidade, o próprio  $\text{CO}_2$  existe na natureza, minimizando consideravelmente os custos ambientais.

Em termos de sugestões para trabalho futuro, e uma vez que a obtenção de um modelo cinético se reveste de especial importância para a modelização da produção deste tipo de ésteres em meio supercrítico, propõe-se a continuação das experiências em reactor fechado que possibilitem a determinação dos parâmetros cinéticos, se possível, de forma independente. Sugere-se também a realização de experiências em reactor tubular de leito fixo para optimização das condições de operação com vista ao desenvolvimento de um processo viável para a produção de acetato de decilo.



## 5. BIBLIOGRAFIA

- Almarsson, Ö., Klivanov A.M., “Remarkable Activation of Enzymes in Nonaqueous Media by Denaturing Organic Cosolvents”, *Biotechnology and Bioengineering* **49** (1995) 87-92.
- Anderson, E.M., Karin, M., Kirk, O., “One biocatalyst – Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis”, *Biocatalysis and Biotransformation* **16** (1998) 181-204.
- Antezac, T., Graczyk, J., Szczesna-Antezak, M., Bielecki, S., “Activation of Mucor circinelloides lipase in organic medium”, *J. Molec. Catal B: Enzym.* **19-20** (2002) 287-294.
- Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M.R., Gama, M., “Engenharia Enzimática”, Lidel, Lisboa (2003).
- Cantone, S., Hanefeld, U., Basso, A., “Biocatalysis in non-conventional media – ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase”, *Green Chemistry*, **9** (2007).954-971.
- Carrea, G., Riva, S., “Properties and Synthetic Applications of Enzymes in organic solvents“, *Angew. Chem. Int. Ed.* **39** (2000) 2226-2254.
- Chen, B., Miller, E.M., Miller, L., Maikner, J.J., Gross, R.A., “Effects of macroporous resin size on *Candida antarctica* lipase B adsorption, fraction of active molecules, and catalytic activity for polyester synthesis“, *Langmuir* **23** (2007) 1381-1387.
- Chiang, S.-F., Kuo, C.-L., Yu, C.-C., Wong, D.S.H., “Design Alternatives for the Amyl Acetate Process: Coupled Reactor/Column and Reactive Distillation”, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41** (2002) 3233-3246.
- Coradin, T., Lopez, P.J., “Biogenic Silica Patterning: Simple Chemistry or Subtle Biology”, *Chem. BioChem.* **4** (2003) 251-259.

Daggett, V., Schroder, S., Kollman, P., “Catalytic pathway of serine proteases – classical and quantum mechanical”, *Journal of the American chemical society* **23** (1991) 8926-8935.

Dordick, J.S., “Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents”, *Enzyme Microb. Technol.* **11** (1989) 194-211.

Essencial Oils: [www.essencialoils.com](http://www.essencialoils.com), consultada em Novembro de 2007.

Farina E.T., Butler, T., Arnold, F.H. “Directed enzyme evolution”, *Current Opinion in Biotechnology* **12** (2001) 545-551.

Gandhi, N.N., Patil, N.S., Sawant, S.B., Joshi, J., “Lipases - Catalyzed Esterification”, *Catalysis Reviews: Science & Engineering* **42** (2000) 439-480.

Garcia-Alles, L.F., Gotor, V., “Lipase-catalyzed transesterification in organic media: Solvent effects on equilibrium and individual rate constants”, *Biotechnol Bioeng.* **59** (1998) 684-694.

Ghanem, A., Aboul-Enein, H.Y., “One-pro synthesis and chiral analysis of cyclopropane derivatives”, *Chirality* **17** (2005) 1-15.

Halling, P., Kvittingen, L. “Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s?”, *Tibtech.* **17** (1999). 343-344.

Hammond, D.A., Karel, M., Klibanov, A.M., Krukonis, V.J., “Enzymatic-Reactions in supercritical gases”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **11** (1985) 393- 400.

Hedstrom, L., “Serine protease mechanism and specificity”, *Chemical Reviews* **102** (2002) 4501-4523.

Itoh, T., Akasaki, E., Kudo, K., “Lipase-catalysed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: Reaction of enzyme anchored to the solvent”, *Chemistry Letters* (2001) 262-263.

Jaeger, K.E., Eggert, T., “Lipases for Biotechnology “, *Current Opinion in Biotechnology* **13** (2002) 390-397.

Kirk, O., Christensen, M.W. “Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin“, *Organic Process Research & Development* **6** (2002) 446 – 451.

Klibanov, A.M., “Enzymes that work in organic solvents“, *Chemtech* (1986) 354-359.

Klibanov, A. M. “Improving enzymes by using them in organic solvents”, *Nature* **409** (2001) 241-246.

Krajewska, B., “Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review”, *Enzyme Micro. Technol.* **35** (2004) 126-139.

Krishna, S.H., “Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media”, *Biotechnol. Adv.* **20** (2002) 239-266.

Kuncová, G., Szilva, J., Hetfleis, J., Sabata, S., “Catalysis in Organic solvents with Lipase immobilized by Sol-Gel Technique”, *J. Sol-Gel Sci. Technol* **26** (2003) 1183-1187.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L., Randal, R., “Protein measurement with Folin phenol reagent “, *Journal of Biological Chemistry* **193** (1951) 265-275.

Lozano, P., Vállora, G., Gómez, D., Gayo, A.B., Sánchez-Conesa, J.A., Rubio, M., Iborra, J.L., “Membrane reactor with immobilized *Candida antarctica* lipase B for ester syntheses in supercritical carbon dioxide “, *Journal of Supercritical Fluids* **29** (2004) 121-128.

Marcilla, R., de Geus, M., Mecerreyes, D., “Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids”, *European Polymer Journal* **42** (2006) 1215-1221.

Mei, Y., Miller, L., Gao, W., Gross, R.A., “Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy”, *Biomacromolecules* **4** (2003) 70-74.

Mesiano, A.J., Beckman, E.J., Russell, A.J. “Supercritical Biocatalysis”, *Chem. Rev* **99** (1999) 623-633.

Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., “Harper’s Illustrated Biochemistry”, 26 Edição, McGraw-Hill (2003).

Nakamura, K, Chi, Y.M, Yamada, Y., “Lipase activity and stability in supercritical carbon-dioxide”, *Chemical Engineering Communications* **45** (1986) 207-212.

Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., “Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B”, *Enzyme and microbial technology* **19** (1996) 328-331.

Poliakoff, M., Fitzpatrick, J.M., Farren, T.R., Anastas, P.T., “Green Chemistry: Science and Politics of Change”, *Science* **297** (2002) 807-810.

Price, N.C., Dwek, R.A., Ratcliffe, R.G., Wormald, M.R., “Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists”, 3ª Edição, *Oxford University Press*, (2001).

Randolph, T.W., Blanch, H.W., Prausnitz, J. M., “Enzymatic Catalysis in a supercritical fluid”, *Biotechnology Letters* **7** (1985) 325-328.

Reetz, M.T., Zonta, A., Simpelkamp, J., “Efficient Heterogeneous Biocatalysts by Entrapment of Lipases in Hydrophobic Sol-Gel Materials”, *Angew. Chem. Int. E.* **34** (1995) 301-303.

Ribeiro, A.S., Ferreira, O., Saracibar, M.M., Vidinha, P., Barreiros, S., Macedo, E.A., Loureiro, J.M., “The Role of Reaction Engineering in Enzyme Catalysis”, – *Book of Abstracts of ISCRE’19-19<sup>th</sup> Internacional Symposium on Chemical Reaction Engineering* 409-410, Germany (2006)

Riemenschneider, W., “Organic Esters”, *Uhlmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Electronic Release*, 7ª Edição, Capítulo 5, Wiley-VCH, Weinheim (2005)

Rotticci, D., Ottosson, J., Norin, T., Hult, K., “Enzymes in nonaqueous solvents methods and protocols”, Editado por Halling, P. J., Holland, H., L. Vulfson, E.N., vol. **15**, **22** (2001) 261-276.

Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Wubbolts, M., Witholt, B. “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature* **409** (2001) 258-268.

Schmid, A., Hollmann, F., Park, J.B., Bühler, B., “The use of enzymes in the chemical industry in Europe “, *Current Opinion in Biotechnology* **13** (2002) 359-366.

Serralha, M.F.N. “Utilização de zeólitos para a imobilização de uma cutinase recombinante”, Tese de Doutoramento Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa (2001).

Smith, J.M., Van Ness, H.C., Abbott, M.M. “Introduction to Chemical Engineering Thermodynamics”, 7ª Edição, McGraw – Hill International Edition (2005).

The Good Scents Company: [www.thegoodscentscompany.com/data/rw1015431.html](http://www.thegoodscentscompany.com/data/rw1015431.html), consultada em Novembro de 2007.

Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A., “The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*”, *Structure* **2** (1994) 293-308.

van Rantwijk, F., Lau, R. M., Sheldon, R. A., “Biocatalytic transformations in ionic liquids”, *Trends in Biotechnology* **21** (2003) 131-138.

van Roon, J.L., Joerink, M., Rijkers, M.P.W.M., Tramper, J., Schroen, C.G.P.H., Beeftink, H.H., “Enzyme Distribution Derived from Macroscopic Particle Behavior of an Industrial Immobilized Penicillin-G Acylase”, *Biotechnology Process*, **19** (2003) 1510-1518.

Vellard, M., “The enzyme as a drug: application of enzymes as pharmaceuticals”, *Current Opinion in Biotechnonology* **14** (2003) 444 – 450.

Verger, V. “Interfacial activation of lipases: facts and artefacts”, *Tibetch* **15** (1997).

Warshel, A., Narayszabo, G., Sussman, F., “How do serine proteases really work”, *Biochemistry* **28** (1989) 3629-3637.

Yadav, G.D., Devi, K.M., “Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparion and kinetic modelling, *Chem. Eng. Sci.* **59** (2004) 373-383.

Yadav, G.V., Trivedi, H.A., “Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media”, *Enzyme and Microbial Technology* **32** (2003) 783-789.

Yahya, A.R.M., Anderson, W.A., Moo-Young, M., “Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions”, *Enzime and Microbial Techology* **23** (1998) 438-450.

Zaks, A., Klibanov, A.M., “Enzyme-catalyzed processes in organic solvents”, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82** (1985) 3192-3196.

Zaks, A., Klibanov, A.M., “Substrate Specifity of enzymes in Organic solvents vs Water is Reversed”, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 2767-2768.

Zaks, A., Klibanov, A.M, “Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents”, *J. Bio. Chem.* **263** (1988) 3194-3201.

Zhang, J., Wu, J., Yang, L., “The kinetic study on lipase-catalyzed asymmetric alcoholsis of a-cyano-benzyl acetate in organic media”, *J. Molecelar Catal. B: Enzym.* **31** (2004) 67-72.

Zhang, T., Yang, L., Zhu, Z., “Determination of internal diffusion limitation and its macroscopic kinetics of transesterification of CPB alcohol catalyzed by immobilized lipase in organic media”, *Enzyme Microb. Technol* **36** (2005) 203-209.





## **ANEXOS**



## **ANEXO I**

A.S. Ribeiro , S. Rebocho , O. Ferreira , P. Vidinha , S. Barreiros , E.A.Macedo, J.M. Loureiro  
“Production of esters by biocatalysed transesterification in supercritical CO<sub>2</sub> and Hexane”, em  
*International Conference on Renewable Resources & Biorefineries*, Ghent, Belgium, 4<sup>th</sup> - 6<sup>th</sup>  
June, 2007



## **Production of esters by biocatalysed transesterification in supercritical CO<sub>2</sub> and Hexane**

A.S. Ribeiro [1], S. Rebocho [2], O. Ferreira [1], P. Vidinha [2], S. Barreiros [2], E.A.Macedo [1], J.M. Loureiro [1]

[1] LSRE - Laboratory of Separation and Reaction Engineering; [2] REQUIMTE/CQBF

LSRE -FEUP, Rua Dr. Roberto Frias, s/n; 4200-465 Porto - Portugal, +351 22 508 16 36, +351 22 508 16 74, [asr@fe.up.pt](mailto:asr@fe.up.pt).

The development of sustainable processes that use renewable raw materials and minimize chemical and energetic waste has attracted considerable attention and represents a great challenge to both academic researchers and industrial experts.

The use of enzymes to catalyse chemical transformations can constitute a more sustainable alternative to some traditional chemical processes and more than 100 biotransformations are already operated at an industrial scale [1]. Lipases usually operate in mild conditions and can catalyse both hydrolytic and synthetic reactions, depending on the surrounding medium. The hydrolysis of esters can be performed in water, but the reverse production reactions are not favoured in this medium, and are usually performed in organic solvents.

Supercritical CO<sub>2</sub> can constitute a more sustainable alternative to organic solvents as a reaction medium, provided that it does not have a direct adverse effect on the enzyme's active site or significantly reduce its activity.

Decyl acetate was chosen as a model compound and its production by a transesterification reaction catalysed by Novozym 435 (immobilized Candida Antarctica Lipase B) was studied in both hexane and supercritical CO<sub>2</sub>. A comparative analysis between these two alternatives was performed, focusing on the differences on the enzyme's catalytic activity, solubilities of the substrates and mass transfer rates; which significantly affect the outcome of the reaction process and its productivity and provide information on when such solvents can be used.

[1] Straathof, A.J.J., Panke, S., Schmid, A. The production of fine chemicals by biotransformations. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(6), 548-556.



## **ANEXO II**

Poster apresentado no Congresso “*International Conference on Renewable Resources & Biorefineries*”, Ghent, Belgium, 4<sup>th</sup> – 6<sup>th</sup> June, 2007